

**PRIORITY
DOCUMENT**

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)



16. Juli 1998

Bescheinigung



Die ASAT AG Applied Science & Technology in Zug/Schweiz hat
eine Patentanmeldung unter der Bezeichnung

"Rekombinante Antikörper"

am 8. Mai 1998 beim Deutschen Patentamt eingereicht und er-
klärt, daß sie dafür die Innere Priorität der Anmeldungen in
der Bundesrepublik Deutschland vom 6. Juni 1997, Aktenzeichen
197 23 904.8 und vom 12. Dezember 1997, Aktenzeichen
197 55 227.7, in Anspruch nehmen.

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wieder-
gabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

Die Anmeldung hat im Deutschen Patentamt vorläufig die Symbol
C 07 K, A 61 K und C 12 N der Internationalen Patentklassi-
fikation erhalten.

München, den 14. Juli 1998

Der Präsident des Deutschen Patentamts
Im Auftrag

Aktenzeichen: 198 20 663.1

Agurks

PATENTANWÄLTE

European Patent Attorneys
European Trade Mark Attorneys

DIP.-ING. **H. WEICKMANN**
DIPL.-ING. **F. A. WEICKMANN**
DIPL.-CHEM. **B. HUBER**
DR.-ING. **H. LISKA**
DIPL.-PHYS. DR. **J. PRECHTEL**
DIPL.-CHEM. DR. **B. BÖHM**
DIPL.-CHEM. DR. **W. WEISS**
DIPL.-PHYS. DR. **J. TIESMEYER**
DIPL.-PHYS. DR. **M. HERZOG**

POSTFACH 860 820
81635 MÜNCHEN

KOPERNIKUSSTRASSE 9
81679 MÜNCHEN

TELEFON (089) 4 55 63-0
TELEX 5 22 621

TELEFAX (089) 4 70 50 68
eMail weickmann@compuserve.com

1-8. Mai 1998

Unser Zeichen:
16824P DE-2/WWvo

eingereicht

Anmelder:
ASAT AG
Applied Science & Technology
Baarerstrasse 77

6302 Zug
Schweiz

Rekombinante Antikörper

Rekombinante Antikörper

Beschreibung

5

Die Erfindung betrifft neue Nukleinsäuresequenzen, die für humane Autoantikörper gegen Blutplättchen-Membranproteine und für antiidiotypische Antikörper kodieren, neue Aminosäuresequenzen von humanen Antikörpern und deren Verwendung für die Diagnostik und Therapie von Krankheiten.

10

15

20

25

30

Autoimmun-thrombozytopenische Purpura (AITP) ist eine Immunkrankheit, die durch eine geringe Blutplättchenzahl bei normaler oder gesteigerter Megakaryozytopoiese definiert ist. Aufgrund des Vorhandenseins von Anti-Plättchen-Autoantikörpern findet eine verstärkte Zerstörung von Plättchen im reticuloendothelialen System (Milz, Leber, Knochenmark) statt. Diese Autoantikörper, die in etwa 75% der AITP Patienten nachgewiesen werden können, sind überwiegend gegen die Plättchenmembran-Glykoproteine (GP) IIb/IIIa und Ib/IX gerichtet. In einem einzigen Patienten können mehrere verschiedene Auto-Antikörper-Spezifitäten gefunden werden (vgl. z.B. Berchtold und Wenger, Blood 81 (1993), 1246-1250; Kiefel et al., Br. J. Haematol. 79 (1991), 256-262; McMillan et al., Blood 70 (1987), 1040 und Fujisawa et al., Blood 79 (1991); 1441). Die Charakterisierung von Bindeepitopen und die Ermittlung der pathogenetischen Signifikanz der Autoantikörper bleibt jedoch schwierig aufgrund der beschränkten Menge an Autoantikörpern, die aus AITP Patienten erhältlich sind. Unter Verwendung der Hybridomatechnik konnten nur wenige humane monoklonale Antikörper aus Lymphozyten von AITP Patienten erhalten werden, die mit GPIIb/IIIa reagieren (Kunicki et al., Hum. Antibodies Hybridomas 1 (1990), 83-95).

Auch bei gesunden Personen wurde das Auftreten natürlicher Autoantikörper gegen verschiedene Selbstantigene berichtet, beispielsweise gegen intrazelluläre und zytoskelettale Komponenten humaner Plättchen (Guilbert et al., J. Immunol. 128 (1982), 2779-2787; Hurez et al., Eur. J. Immunol. 23 (1993), 783-789 und Pfueller et al., Clin. Exp. Immunol. 79 (1990), 367-373). Einige dieser im Serum gesunder Personen beobachteten Autoantikörper können auch gegen Plättchenmembranproteine gerichtet sein (Souberbielle, Eur. J. Haematol. 56 (1996), 178-180). Die Rolle dieser natürlichen Autoantikörper sowie ihre Beziehung zu Krankheits-assoziierten Autoantikörpern ist jedoch noch unbekannt.

Zur Behandlung von AITP können Corticosteroide eingesetzt werden. Etwa die Hälfte der Patienten reagiert auf eine Verabreichung von Prednison innerhalb von 4 Wochen, Langzeitremissionen werden jedoch nur selten gefunden. Bei Patienten, die starke Blutungen oder extrem geringe Plättchenzahlen aufweisen, wird als Notfallbehandlung die Verabreichung hoher Dosen von intravenösem Immunglobulin (IVIgG) empfohlen. Nach dieser Behandlung folgt ein schneller, aber üblicherweise nur vorübergehender Anstieg der Plättchenzahl bei den meisten Patienten. Die Wirkmechanismen von Corticosteroiden sowie von IVIgG bei der Behandlung der AITP sind noch unbekannt. Durch Untersuchungen von Berchtold et al., (Blood 74 (1989), 2414-2417 und Berchtold und Wenger, Blood 81 (1993), 1246-1250) ist bekannt, daß die Bindung von Autoantikörpern an Plättchen-Glykoproteine durch antiidiotypische Antikörper in IVIgG gehemmt werden kann.

Das der vorliegenden Anmeldung zugrundeliegende Problem besteht darin, neue DNA Sequenzen zu identifizieren, welche für die Bindung von Autoantikörpern an GPIIb/IIIa verantwortlich sind. Auf diese Weise können neue pharmazeutische Präparate bereitgestellt werden, welche zur Verbesserung der Diagnose und Therapie von AITP eingesetzt werden können.

Die Identifizierung von Bindesequenzen aus Autoantikörpern gelang überraschenderweise nach Herstellung einer kombinatorischen Phagemid-Displaybibliothek von schweren und leichten Ketten humaner Antikörper unter Verwendung peripherer zirkulierender B-Zellen eines gesunden humanen Spenders. Nach Präsentation humaner schwerer und leichter Antikörper Fab-Fragmente an der Oberfläche des filamentösen Phagen M13 konnten Phagen-Klone identifiziert werden, welche eine spezifische Bindung an GPIIb/IIIa zeigen.

Hierzu wurde die Phagemid-Bibliothek aufeinanderfolgend mit thrombasthenischen Plättchen ohne GPIIb/IIIa (negative Selektion) und normalen Plättchen (positive Selektion) in Kontakt gebracht. Nach mehreren Runden der Selektion und Amplifikation durch Infektion von E.coli wurden 23 Klone erhalten, die an den GPIIb/IIIa Komplex binden können. Inhibierungsstudien unter Verwendung Pools monoklonaler Antikörper gegen GPIIb/IIIa ergaben zwei Gruppen von Klonen: Beide Gruppen wurden durch monoklonale Antikörper, die spezifisch für den GPIIb/IIIa Komplex waren, inhibiert, und eine Gruppe auch durch einen GPIIb spezifischen monoklonalen Antikörper. Diese Befunde wurden durch DNA-Analyse der Klone bestätigt, die das Vorhandensein von 2 unterschiedlichen Anti-GPIIb/IIIa Phagen-Klonen ergab. Diese Ergebnisse zeigen, daß 2 GPIIb/IIIa spezifische Phagen-Klone, d.h. Autoantikörper, aus dem Genom einer gesunden Person kloniert werden können und daß diese Klone Konformationsepitope des GPIIb/IIIa Komplexes erkennen können. Durch Inhibierungsstudien wurde weiterhin festgestellt, daß beide Phagen-Klone die Bindung von Plättchen-assoziierten Autoantikörpern aus Patienten mit AITP an gereinigtes GPIIb/IIIa hemmen und somit vermutlich AITP-assoziierte Epitope von GPIIb/IIIa erkennen. Da die Phagen-Klone die Antigenbindesequenzen natürlicher Autoantikörper enthalten, die aus dem Genom einer gesunden Person stammen, kann dieser Befund zu neuen Erkenntnissen über den Ursprung Plättchen-assoziiierter Autoantikörper in AITP führen.

Darüber hinaus ist es unter Verwendung der erfindungsgemäßen Phagen-Klone möglich, rekombinante antiidiotypische Antikörper gegen Anti-GPIIb/IIIa Autoantikörper zu erzeugen, wobei die Anti-GPIIb/IIIa Phagen-Klone als Antigen verwendet werden. Die auf diese Weise erhältlichen rekommen-
5 rekombinanten antiidiotypischen Antikörper stellen eine interessante klinische Alternative zur Verwendung von IVIgG dar.

Die Nukleotid- und davon abgeleitete Aminosäuresequenzen der identifizier-
ten Phagen-Klone sind in den Sequenzprotokollen SEQ ID No.1 bis 8
10 (Autoantikörper) bzw. SEQ ID No. 9 bis 18 (antiidiotypische Antikörper) dargestellt.

I. Autoantikörper

15 Ein erster Aspekt der vorliegenden Erfindung betrifft Nukleinsäuren, die für Autoantikörper kodieren. Ein Gegenstand der Erfindung ist somit eine Nukleinsäure, die für die schwere Kette eines humanen Antikörpers, ein funktionelles Derivat oder ein Fragment davon kodiert und eine CDR3-Region umfaßt, ausgewählt aus:

20 (a) einer für die Aminosäuresequenz:
V L P F D P I S M D V (I)

kodierenden Nukleotidsequenz,

(b) einer für die Aminosäuresequenz:
A L G S W G G W D H Y M D V (II)

25 kodierenden Nukleotidsequenz,

(c) einer Nukleotidsequenz, die für eine Aminosäuresequenz von mindestens 80% und vorzugsweise von mindestens 90% zu einer Aminosäuresequenz aus (a) oder (b) kodiert und

(d) einer Nukleotidsequenz, die für eine Aminosäuresequenz mit
30 einer äquivalenten Bindefähigkeit an GPIIb/IIIa kodiert.

Die erfindungsgemäße Nukleinsäure umfaßt weiterhin vorzugsweise eine CDR1-Region ausgewählt aus

- 5 (a) einer für die Aminosäuresequenz:
G Y S W R (III)
kodierenden Nukleotidsequenz,
- (b) einer für die Aminosäuresequenz:
S Y A M H (IV)
kodierenden Nukleotidsequenz und
- 10 (c) einer Nukleotidsequenz, die für eine Aminosäuresequenz mit
einer Homologie von mindestens 80% und vorzugsweise
mindestens 90% zu einer Aminosäuresequenz aus (a) oder (b)
kodiert.

15 Vorzugsweise umfaßt die erfindungsgemäße Nukleinsäure weiterhin eine CDR2-Region ausgewählt:

- (a) einer für die Aminosäuresequenz:
D I S Y S G S T K Y K P S L R S (V)
kodierenden Nukleotidsequenz,
- 20 (b) einer für die Aminosäuresequenz:
V I S Y D G S N K Y Y A D S V K G (VI)
kodierenden Nukleotidsequenz und
- (c) einer Nukleotidsequenz, die für eine Aminosäuresequenz mit
einer Homologie von mindestens 80% und vorzugsweise von
mindestens 90% zu einer Aminosäuresequenz aus (a) oder (b)
25 kodiert.

Ein zweiter Aspekt der vorliegenden Erfindung ist eine Nukleinsäure, die für die leichte Kette eines humanen Antikörpers, ein funktionelles Derivat oder ein Fragment davon kodiert und eine CDR3-Region umfaßt, ausgewählt aus:

- 30 (a) einer für die Aminosäuresequenz:
A T W D D G L N G P V (VII)

- kodierenden Nukleotidsequenz,
(b) einer für die Aminosäuresequenz:
A A W D D S L N G W V (VIII)

- 5 (c) einer Nukleotidsequenz, die für eine Aminosäuresequenz mit
einer Homologie von mindestens 80% und vorzugsweise von
mindestens 90% zu einer Aminosäuresequenz aus (a) oder (b)
kodiert und
(d) einer Nukleotidsequenz, die für eine Aminosäuresequenz mit
10 einer äquivalenten Bindefähigkeit an GPIIb/IIIa kodiert.

Vorzugsweise umfaßt die erfindungsgemäße Nukleinsäure weiterhin eine
CDR1-Region ausgewählt aus:

- (a) einer für die Aminosäuresequenz:
15 S G S S S N I R S N P V S (IX)
kodierenden Nukleotidsequenz,
(b) einer für die Aminosäuresequenz:
S G S S S N I G S N T V N (X)
kodierenden Nukleotidsequenz und
20 (c) einer Nukleotidsequenz, die für eine Aminosäuresequenz mit
einer Homologie von mindestens 80% und vorzugsweise von
mindestens 90% zu einer Aminosäuresequenz aus (a) oder (b)
kodiert.

25 Darüber hinaus umfaßt die erfindungsgemäße Nukleinsäure vorzugsweise
weiterhin eine CDR2-Region ausgewählt aus:

- (a) einer für die Aminosäuresequenz:
G S H Q R P S (XI)
kodierenden Nukleotidsequenz,
30 (b) einer für die Aminosäuresequenz:
S N N Q R P S (XII)
kodierenden Nukleotidsequenz und

- (c) einer Nukleotidsequenz, die für eine Aminosäuresequenz mit einer Homologie von mindestens 80% und vorzugsweise mindestens 90% zu einer Aminosäuresequenz aus (a) oder (b) kodiert.

5

II. Antiidiotypische Antikörper

Ein zweiter Aspekt der vorliegenden Erfindung betrifft Nukleinsäuren, die für antiidiotypische Antikörper kodieren. Ein Gegenstand der Erfindung ist somit
10 eine Nukleinsäure, die für die schwere Kette eines humanen Antikörpers, ein funktionelles Derivat oder ein Fragment davon kodiert, und eine CDR3-Region umfaßt, ausgewählt aus:

- (a) einer für die Aminosäuresequenz:
V R D L G Y R V L S T F T F D I (XIII)
15 kodierenden Nukleotidsequenz,
- (b) einer für die Aminosäuresequenz:
D G R S G S Y A R F D G M D V (XIV)
kodierenden Nukleotidsequenz,
- (c) einer für die Aminosäuresequenz:
20 M G S S V V A T Y N A F D I (XV)
kodierenden Nukleotidsequenz,
- (d) einer für die Aminosäuresequenz:
D A D G D G F S P Y Y F P Y (XVI)
kodierenden Nukleotidsequenz,
- 25 (e) einer Nukleotidsequenz, die für eine Aminosäuresequenz mit einer Homologie von mindestens 80% und vorzugsweise von mindestens 90% zu einer Aminosäuresequenz aus (a), (b), (c) oder (d) kodiert und
- (f) einer Nukleotidsequenz, die für eine Aminosäuresequenz mit
30 einer äquivalenten Bindefähigkeit an Autoantikörper gegen GPIIb/IIIa kodiert.

Die erfindungsgemäße Nukleinsäure umfaßt weiterhin vorzugsweise eine CDR1-Region ausgewählt aus: einer für die in Tab. 7 gezeigten Aminosäuresequenzen N F A M S, S Y T M H oder D Y A L H, S H Y W S3 kodierenden Nukleotidsequenz und einer Nukleotidsequenz, die für eine
5 Aminosäuresequenz mit einer Homologie von mindestens 80% und vorzugsweise mindestens 90% zu einer der zuvor genannten Aminosäuresequenzen kodiert.

Vorzugsweise umfaßt die erfindungsgemäße Nukleinsäure weiterhin eine
10 CDR2- Region ausgewählt aus einer für die in Tab. 7 gezeigten Aminosäuresequenzen G I S G G G L L T H Y A (D/N) S V K G, L I S Y D G S N K Y Y A D S V K G, G I S W D S T S I G Y A D S V K G oder F I Y D G A R T R F N P S L R S kodierenden Nukleotidsequenz und einer Nukleotidsequenz,
15 die für eine Aminosäuresequenz mit einer Homologie von mindestens 80% und vorzugsweise von mindestens 90% zu einer der zuvor genannten Aminosäuresequenzen kodiert.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist eine Nukleinsäure, die für die leichte Kette eines humanen Antikörpers, ein funktionelles Derivat
20 oder ein Fragment davon kodiert und eine CDR3-Region umfaßt, ausgewählt aus:

- (a) einer für die Aminosäuresequenz
C S Y V H S S T N (XVII)
25 kodierenden Nukleotidsequenz,
- (b) einer Nukleotidsequenz, die für eine Aminosäuresequenz mit einer Homologie von mindestens 80% und vorzugsweise mindestens 90% zu einer Aminosäuresequenz aus (a) kodiert und
- 30 (c) einer Nukleotidsequenz, die für eine Aminosäuresequenz mit einer äquivalenten Binefähigkeit an Autoantikörper gegen GPIIb/IIIa kodiert.

Vorzugsweise umfaßt die erfindungsgemäße Nukleinsäure weiterhin eine CDR1-Region ausgewählt aus einer für die in Tab. 7 gezeigte Aminosäuresequenz T G T S S A I G N Y N F V P kodierenden Nukleotidsequenz und einer Nukleotidsequenz, die für eine Aminosäuresequenz mit einer Homologie von mindestens 80% und vorzugsweise von mindestens 90% zur der zuvor genannten Aminosäuresequenz kodiert.

Darüber hinaus umfaßt die erfindungsgemäße Nukleinsäure vorzugsweise weiterhin eine CDR2-Region ausgewählt aus einer für die in Tab. 7 gezeigte Aminosäuresequenz E G S K R P S kodierenden Nukleotidsequenz und einer Nukleotidsequenz, die für eine Aminosäuresequenz mit einer Homologie von mindestens 80% und vorzugsweise mindestens 90% zu der zuvor genannten Aminosäuresequenz kodiert.

Unter dem Begriff "funktionelles Derivat einer Kette eines humanen Antikörpers" im Sinne der vorliegenden Erfindung ist ein Polypeptid zu verstehen, das mindestens eine CDR3-Region der schweren oder/und leichten Kette wie vorstehend definiert umfaßt und zusammen mit der jeweiligen komplementären Kette des humanen Antikörpers (oder einem Derivat einer solchen Kette) ein Antikörperderivat bilden kann, das eine äquivalente Erkennungsspezifität für ein Antigen wie der nicht derivatisierte Antikörper besitzt. Vorzugsweise weist ein derartiges Antikörperderivat eine Bindungskonstante von mindestens 10^{-6} l/mol, vorzugsweise von mindestens 10^{-8} l/mol für das jeweilige Antigen auf.

Die Herstellung funktioneller Derivate von Ketten eines humanen Antikörpers kann beispielsweise durch Deletion, Substitution oder/und Insertion von Abschnitten des für das jeweilige Polypeptid kodierenden Gens durch rekombinante DNA-Techniken erfolgen.

Besonders bevorzugte funktionelle Derivate von Antikörperketten oder Antikörper sind Einzelkettenantikörper, die beispielsweise aus den variablen

Domänen der H- und L-Kette sowie gegebenenfalls einer konstanten Domäne zusammengesetzt sein können. Die Herstellung solcher Konstrukte ist bei Hoogenboom et al., Immunol. Rev. 130 (1992), 41-68; Barbas III, Methods: Companion Methods Enzymol. 2 (1991), 119 und Plückthun, 5 Immunochemistry (1994), Marcel Dekker Inc., Kapitel 9, 210-235 beschrieben.

Unter dem Begriff "äquivalente Bindefähigkeit" im Sinne der vorliegenden Erfindung ist eine gleiche Bindeaffinität oder/und Spezifität, d.h. Epi- 10 toperkennung wie in den konkret offenbarten Sequenzen zu verstehen.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein Vektor, der mindestens eine Kopie einer erfindungsgemäßen Nukleinsäure enthält. Dieser Vektor kann ein prokaryontischer Vektor oder ein eukaryontischer 15 Vektor sein. Beispiele für prokaryontische Vektoren sind Plasmide, Cosmide und Bakteriophagen. Derartige Vektoren sind beispielsweise bei Sambrook et al., Molecular Cloning. A Laboratory Manual, 2nd Edition (1989), Cold Spring Harbor Laboratory Press, in den Kapiteln 1 bis 4 ausführlich beschrieben. Vorzugsweise ist ein prokaryontischer Vektor ein Plasmid oder 20 ein Phage.

Andererseits kann der Vektor auch ein eukaryontischer Vektor sein, z.B. ein Hefevektor, ein Insektenvektor (Baculovirus) oder ein Säugervektor (Plasmidvektor oder viraler Vektor). Beispiele für eukaryontische Vektoren 25 sind bei Sambrook et al., supra, Kapitel 16 und Winnacker, Gene und Klone, Eine Einführung für die Gentechnologie (1985), VCH Verlagsgesellschaft insbesondere Kapitel 5, 8 und 10, beschrieben.

Noch ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist eine Zelle, die 30 eine erfindungsgemäße Nukleinsäure exprimiert, oder eine Zelle, die mit einer erfindungsgemäßen Nukleinsäure oder mit einem erfindungsgemäßen Vektor transformiert ist. Die Zelle kann eine prokaryontische Zelle (z.B. eine

gram-negative Bakterienzelle, insbesondere E.coli) oder eine eukaryontische Zelle (z.B. eine Hefe-, Pflanzen- oder Säugerzelle) sein. Beispiele für geeignete Zellen und Verfahren zum Einführen der erfindungsgemäßen Nukleinsäure in derartige Zellen finden sich den obigen Literaturstellen.

5

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein Polypeptid, das von einer erfindungsgemäßen Nukleinsäure kodiert ist, insbesondere ein rekombinantes Polypeptid. Besonders bevorzugt enthält das Polypeptid die variable Domäne der H- oder/und L-Kette eines humanen Antikörpers.

10

Besonders bevorzugt ist ein Polypeptid, das Antikörpereigenschaften aufweist und aus einer schweren Kette oder einem funktionellen Derivat davon sowie aus einer leichten Kette oder einem funktionellen Derivat davon als Untereinheiten aufgebaut ist. Das Polypeptid kann aus zwei separaten Ketten zusammengesetzt sein oder als Einzelkettenpolypeptid vorliegen.

15

Noch ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein Antikörper gegen ein erfindungsgemäßes Polypeptid, der gegen ein für die Erkennung des Antigens verantwortliche Region des Polypeptids gerichtet ist. Dieser Antikörper kann ein polyklonales Antiserum, ein monoklonaler Antikörper oder ein Fragment eines polyklonalen oder monoklonalen Antikörpers (z.B. ein Fab-, $F(ab)_2$ -, Fab'- oder $F(ab')_2$ Fragment) sein. Vorzugsweise ist der Antikörper gegen die CDR3-Region der schweren oder/und leichten Antikörperkette des erfindungsgemäßen Polypeptids oder einen Bereich davon gerichtet. Derartige Antikörper können nach an sich bekannten Methoden durch Immunisierung eines Versuchstiers mit einem Peptid oder Polypeptid, welches eine erfindungsgemäße CDR3-Region enthält, und Gewinnung der resultierenden polyklonalen Antikörper aus dem Versuchstier erhalten werden. Weiterhin können monoklonale Antikörper durch Fusion einer Antikörper-produzierenden B-Zelle des Versuchstiers mit einer Leukämiezelle nach der Methode von Köhler und Milstein oder einer Weiterentwicklung davon erhalten werden. Darüber hinaus können

20
25
30

rekombinante Antikörper, die gegen die CDR3-Region des erfindungsgemäßen Polypeptids gerichtet sind, auch durch Musterung einer geeigneten Phagemid-Bibliothek, z.B. einer Phageimid-Bibliothek aus einem gesunden humanen Spender, erhalten werden, wobei als Antigen ein erfindungsgemäßes Polypeptid verwendet wird.

Die Erfindung betrifft auch eine pharmazeutische Zusammensetzung, die eine Nukleinsäure, einen Vektor, ein Polypeptid, einen Antikörper oder eine Zelle wie zuvor genannt, als aktive Komponente, gegebenenfalls zusammen mit anderen aktiven Komponenten sowie pharmazeutisch üblichen Hilfs-, Zusatz- oder Trägerstoffe enthält.

Die pharmazeutische Zusammensetzung kann zur Herstellung eines diagnostischen oder therapeutischen Mittels eingesetzt werden. Beispiele für diagnostischen Anwendungen sind die Diagnose von AITP oder einer Prädisposition für AITP. Eine weitere bevorzugte diagnostische Anwendung ist die Überwachung des Krankheitsverlaufs bei AITP.

Der Einsatz der pharmazeutischen Zusammensetzung als diagnostisches Mittel kann beispielsweise den Nachweis einer B-Zellsubpopulation umfassen, welche ein erfindungsgemäßes Polypeptid als Antikörper exprimiert. Der Nachweis dieses Antikörpers kann beispielsweise auf Nukleinsäureebene, z.B. durch einen Nukleinsäure-Hybridisierungs-Assay gegebenenfalls mit vorgeschalteter Amplifikation erfolgen. Andererseits kann der Nachweis auch auf Proteinebene durch einen Immunoassay unter Verwendung von spezifisch mit dem Polypeptid reagierenden Antigenen oder Antikörpern erfolgen.

Weiterhin kann die erfindungsgemäße pharmazeutische Zusammensetzung auch auf therapeutischem Gebiet angewandt werden, insbesondere zur Prävention oder Therapie von AITP. Diese therapeutische Anwendung kann beispielsweise darauf beruhen, daß eine Stimulierung der Produktion von

Anti-Autoantikörpern erfolgt. Hierzu kann beispielsweise das erfindungs-
gemäße Autoantikörper-Polypeptid einem Patienten verabreicht werden,
wodurch die Bildung von antiidiotypischen Antikörpern hervorgerufen
oder/und stimuliert wird. Diese Verabreichung kann dabei nach üblichen
5 Immunisierungsprotokollen (Fox et al., J. Pharmacol. Exp. Ther. 279 (1996),
1000-1008; Whittum-Hudson et al., Nat. Med. 2 (1996), 1116-1121;
Jardieu, Curr. Opin. Immunol. 7 (1995), 779-782) erfolgen. Andererseits
kann die Expression von Antikörpergenen spezifisch durch Verabreichung
geeigneter Antisense-Nukleinsäuren gehemmt werden. Das erfindungs-
10 gemäße antiidiotypische Antikörper-Polypeptid kann einem Patienten
verabreicht werden, um eine direkte Hemmung der Autoantikörper-Aktivität
zu erreichen.

Untersuchungen der erfindungsgemäßen Autoantikörper-Polypeptide
15 zeigten, daß diese überraschenderweise in der Lage sind, die Bindung von
Fibrinogen an Blutplättchen zu hemmen. Die erfindungsgemäßen Auto-
antikörper-Polypeptide und antiidiotypischen Antikörper-Polypeptide können
daher gegebenenfalls in Kombination als Mittel zur Modulation der
Blutgerinnung eingesetzt werden, insbesondere zur Verhinderung einer
20 Thrombose, beispielsweise nach Herzinfarkten, Schlaganfällen oder bei
venösen Thrombosen mit Lungenembolien oder Ischämien etc.

Bisher wurden für therapeutische Zwecke als Fibrinogenantagonisten murine
monoklonale Antikörper, z.B. der monoklonale Antikörper 7E3 (vgl. z.B. US-
25 Patent 5,440,020) oder Fragmente davon (z.B. das kommerziell erhältliche
Fab Fragment ReoPro®) oder kurze synthetische Peptide eingesetzt. Murine
monoklonale Antikörper und Antikörperfragmente haben jedoch den
Nachteil, daß sie bei der Behandlung von humanen Patienten aufgrund ihrer
Immunogenität zu unerwünschten Nebenreaktionen führen, während kurze
30 Peptide im allgemeinen sehr schnell abgebaut werden. Gegenüber diesen
bekannten Mitteln haben die erfindungsgemäßen Polypeptide den Vorteil,
daß sie aus Aminosäuresequenzen humanen Ursprungs bestehen und daher

geringere unerwünschte Nebenwirkungen als entsprechende murine Antikörper oder Antikörperfragmente aufweisen, und daß sie aufgrund ihrer Größe nicht einem so schnellen Abbau wie Peptide unterliegen.

- 5 Die Erfindung betrifft somit die Verwendung einer erfindungsgemäßen Nukleinsäure, insbesondere einer für ein Autoantikörper-Polypeptid kodierenden Nukleinsäure, eines dieser Nukleinsäure enthaltenden Vektors, einer mit der Nukleinsäure oder dem Vektor transformierten Zelle, eines von der Nukleinsäure kodierten Polypeptids oder einer pharmazeutischen Zusammen-
- 10 setzung, die eine oder mehrere der genannten Substanzen enthält, zur Herstellung eines Mittel für die Beeinflussung und insbesondere die Hemmung der Bindung von Fibrinogen an Blutplättchen. Vorzugsweise wird das Mittel zur Modulation der Blutgerinnung eingesetzt, insbesondere für die Auflösung von Thromben oder/und für die Prävention der Thrombenbildung.
- 15 Die Verabreichung der erfindungsgemäßen pharmazeutischen Zusammensetzung kann nach bereits für murine Antikörper oder Antikörperfragmente etablierten Protokollen erfolgen.

Weiterhin wird die Erfindung durch nachfolgende Beispiele, Figuren und

20 Sequenzprotokolle erläutert. Es zeigen:

- SEQ ID No. 1 Die Nukleotidsequenz der H-Kette eines erfindungsgemäßen Antikörpers (Phagemidklon PDG7), wobei Framework-Region (FR)1 von bp 1-90, Komplement-
- 25 bestimmende Region (CDR)1 von bp 91-105, FR2 von bp 106-147, CDR2 von bp 148-195, FR3 von bp 196-291, CDR3 von bp 292-324 und FR4 von bp 325-357 reicht,
- 30 SEQ ID No. 2 die Aminosäuresequenz zu der in SEQ ID No. 1 dargestellten Nukleotidsequenz, wobei FR1 von A.S. 1-30, CDR1 von A.S. 31-35, FR2 von A.S. 36-49, CDR2 von

A.S. 50-65, FR3 von A.S. 66-97, CDR3 von A.S. 98-108 und FR4 von A.S. 109-119 reicht,

- 5 SEQ ID No. 3 die Nukleotidsequenz der L-Kette eines erfindungs-
gemäßen Polypeptids (Phagemidklon PDG7), wobei FR1
von bp 1-60, CDR1 von bp 61-99, FR2 von bp 100-
144, CDR2 von bp 145-165, FR3 von bp 166-261,
CDR3 von bp 262-294 und FR4 von bp 295-333 reicht,
- 10 SEQ ID No. 4 die Aminosäuresequenz zu der in SEQ ID No. 3 angege-
benen Nukleotidsequenz, wobei FR1 von A.S. 1-20,
CDR1 von A.S. 21-33, FR2 von A.S. 34-48, CDR2 von
A.S. 49-55, FR3 von A.S. 56-87, CDR3 von A.S. 88-98
und FR4 von A.S. 99-111 reicht,
- 15 SEQ ID No. 5 die Nukleotidsequenz der H-Kette eines erfindungs-
gemäßen Polypeptids (Phagemidklon PDG13), wobei
FR1 von bp 1-90, CDR1 von bp 91-109, FR2 von bp
106-147, CDR2 von bp 148-198, FR3 von bp 199-294,
20 CDR3 von bp 295-336 und FR4 von bp 337-369 reicht,
- 25 SEQ ID No. 6 die Aminosäuresequenz der in SEQ ID No. 5 dargestell-
ten Nukleotidsequenz, wobei FR1 von A.S. 1-30, CDR1
von A.S. 31-35, FR2 von A.S. 36-49, CDR2 von A.S.
50-66, FR3 von A.S. 67-98, CDR3 von A.S. 99-112
und FR4 von A.S. 113-123 reicht,
- 30 SEQ ID No. 7 die Nukleotidsequenz der L-Kette eines erfindungs-
gemäßen Polypeptids (Phagemidklon PGD13), wobei
FR1 von bp 1-60, CDR1 von bp 61-99, FR2 von bp
100-144, CDR2 von bp 145-165, FR3 von bp 166-261,
CDR3 von bp 262-294 und FR4 von bp 295-333 reicht,

- 5 SEQ ID No. 8 die Aminosäuresequenz der in SEQ ID No. 7 dargestellten Nukleotidsequenz, wobei FR1 von A.S. 1-20, CDR1 von A.S. 21-33, FR2 von A.S. 34-48, CDR2 von A.S. 49-55, FR3 von A.S. 56-87, CDR3 von A.S. 88-98 und FR4 von A.S. 99-111 reicht,
- 10 SEQ ID No. 9 die Nukleotidsequenz der H-Kette eines erfindungsgemäßen Polypeptids (Phagemidklon AI-X16), wobei FR1 von bp 1-90, CDR1 von bp 91-105, FR2 von bp 106-147, CDR2 von bp 148-198, FR3 von bp 199-288, CDR3 von bp 289-336 und FR4 von bp 337-369 reicht,
- 15 SEQ ID No. 10 die Aminosäuresequenz der in SEQ ID No. 9 dargestellten Nukleotidsequenz, wobei FR1 von A.S. 1-30, CDR1 von A.S. 31-35, FR2 von A.S. 36-49, CDR2 von A.S. 50-66, FR3 von A.S. 67-96, CDR3 von A.S. 97-112 und FR4 von A.S. 113-123 reicht,
- 20 SEQ ID No. 11 die Nukleotidsequenz der L-Kette eines erfindungsgemäßen Polypeptids (Phagemidklon AI-X16), wobei FR1 von bp 1 bis 60, CDR1 von bp 61-102, FR2 von bp 103-147, CDR2 von 148-168, FR3 von bp 169-264, CDR3 von 265-291 und FR4 von bp 292-375 reicht,
- 25 SEQ ID No. 12 die Aminosäuresequenz der in SEQ ID No. 11 dargestellten Nukleotidsequenz, wobei FR1 von A.S. 1-20, CDR1 von A.S. 21-34, FR2 von A.S. 35-49, CDR2 von A.S. 50-56, FR3 von A.S. 57-88, CDR3 von A.S. 89-97 und FR4 von A.S. 89-125 reicht,
- 30 SEQ ID No. 13 die Nukleotidsequenz der H-Kette eines erfindungsgemäßen Polypeptids (Phagemidklon AI-X20), wobei

FR1 von bp 1-90, CDR1 von bp 91-105, FR2 von bp 106-147, CDR2 von bp 148-195, FR3 von bp 196-291, CDR3 von von bp 292-333 und FR4 von bp 334-366 reicht,

5

SEQ ID No. 14 die Aminosäuresequenz der in SEQ ID No. 13 dargestellten Nukleotidsequenz, wobei FR1 von A.S. 1-30, CDR1 von A.S. 31-35, FR2 von A.S. 36-49, CDR2 von A.S. 50-65, FR3 von A.S. 66-97, CDR3 von A.S. 98-111 und FR4 von A.S. 112-122 reicht,

10

SEQ ID No. 15 die Nukleotidsequenz der H-Kette eines erfindungsgemäßen Polypeptids (Phagemidklon AI-X39), wobei FR1 von bp 1-90, CDR1 von bp 91-105, FR2 von bp 106-147, CDR2 von pb 148-198, FR3 von bp 199-294, CDR3 von bp 295-339 und FR4 von 340-372 reicht,

15

SEQ ID No. 16 die Aminosäuresequenz der in SEQ ID No. 15 dargestellten Nukleotidsequenz, wobei FR1 von A.S. 1-30, CDR1 von A.S. 31-35, FR2 von A.S. 36-49, CDR2 von A.S. 50-66, FR3 von A.S. 67-98, CDR3 von A.S. 99-113 und FR4 von A.S. 114-124 reicht,

20

SEQ ID No. 17 die Nukleotidsequenz der H-Kette eines erfindungsgemäßen Polypeptids (Phagemidklon AI-X40), wobei FR1 von bp 1-90, CDR1 von bp 91-105, FR2 von bp 106-147, CDR2 von bp 148-198, FR3 von bp 199-297, CDR3 von bp 298-339 und FR4 von bp 340-372 reicht und

25

SEQ ID No. 18 die Aminosäuresequenz der in SEQ ID No. 17 dargestellten Nukleotidsequenz, wobei FR1 von A.S. 1 bis 30,

30

CDR1 von A.S. 31-35, FR2 von A.S. 36-49, CDR2 von A.S. 50-66, FR3 von A.S. 67-99, CDR3 von A.S. 100-113 und FR4 von A.S. 114-124 reicht,

- 5 **Figur 1** die Hemmung der Bindung von Autoantikörper-Phabs (PDG-X) an GPIIb/IIIa durch Zusatz des antiidiotypischen Antikörper-Phab AI-X17.
- 10 **Figur 2** die Bindung von Autoantikörper-Phabs an unbehandelte und EDTA-behandelte Blutplättchen,
- 15 **Figur 3** die Hemmung der Fibrinogenbindung an GPIIb/IIIa durch Autoantikörper-Phabs,
- 15 **Figur 4-6** die Hemmung der Bindung von Autoantikörper-Phabs an GPIIb/IIIa durch den Antikörper 7E3 und das Antikörperfragment ReoPro®.

Beispiele

20

1. Identifizierung von Autoantikörpersequenzen

1.1. Gewinnung von Autoantikörpern

- 25 Autoantikörper von 12 Patienten mit AITP (8 mit primärer AITP, 3 mit AITP assoziiert mit SLE, 1 mit AITP assoziiert mit Sjögren's Syndrom) wurden durch Inkubation von Patientenplasma über Nacht mit gereinigtem GPIIb/IIIa bei 4°C und anschließende Elution in 0,2 mol/l Glycin und 0,15 mol/l NaCl pH 2,5 für 15 min bei Raumtemperatur erhalten. Nach Zentrifugation für 30
- 30 min bei 100.000 g wurde der Überstand mit 1 mol/l Tris-HCl neutralisiert und über Nacht gegen Tris-gepufferte Salzlösung (TBS) dialysiert.

Zum Zeitpunkt der Plasmaentnahme waren alle Patienten thrombozytopenisch (Plättchenzahl $< 150 \times 10^9/l$) und hatten normale oder vergrößerte Megakaryozyten im Knochenmark und waren frei von anderen nachweisbaren Formen der Immunthrombozytopenie.

5

1.2. Gewinnung gereinigter Antigene

Als Antigene wurden gereinigtes GPIIb/IIIa, ein zytoplasmatisches Fragment von GPIIIa (Aminosäuren 721-744) und ein extrazelluläres Fragment von GPIIIa (Aminosäuren 468-690) verwendet (Beardsley, Blut 59 (1989), 47-51 und Phillips et al., Methods Enzymol. 215 (1992), 244-263).

10

1.3. Gewinnung von Plättchen zum Panning und Immunoblotting

Aus EDTA-antikoagulierten Blutproben gesunder humander Spender wurde Plättchen-angereichertes Plasma durch differenzielle Zentrifugation hergestellt. Die Plättchen wurden durch Zentrifugation bei 2000 g für 15 min isoliert, sechsmal in Zitronensäurepuffer (pH 6,2) mit 50 mmol/l Natriumcitrat, 100 mmol/l NaCl und 125 mmol/l Dextrose gewaschen und schließlich im gleichen Puffer resuspendiert.

20

Thrombasthenische Plättchen wurden aus einem 14 Jahre alten an Thrombasthenie Glanzmann Typ I erkrankten Jungen unter Verwendung des gleichen Anreicherungsprotokolls erhalten.

25

1.4. Monoklonale Antikörper

Es wurden murine monoklonale Antikörper verwendet, welche die komplexierte Form von GPIIb/IIIa erkennen, sowie Antikörper, die selektiv GPIIb oder GPIIIa erkennen. Diese Antikörper wurden mit üblichen Immunisierungsprotokollen unter Verwendung der entsprechenden Antigene gewonnen und sind nicht AITP-assoziiert. Die Gewinnung solcher Antikörper

30

ist bei Kouns et al. (J. Biol. Chem. 267 (1992), 18844-18851), Steiner et al. (Biochim. Biophys. Acta 1119 (1992), 12-21) und Häring et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82 (1985), 4837-4841) beschrieben.

5 **1.5. Phagemid-Bibliothek**

Eine kombinatorische Fab-Bibliothek wurde nach der von Vogel et al. (Eur. J. Immunol. 24 (1994), 1200-1207) beschriebenen Methode hergestellt, wobei periphere Blutlymphozyten aus einem gesunden präimmunisierten humanen Spender verwendet wurden. Alle Enzyme und Oligonukleotide wurden von Boehringer Mannheim GmbH (Mannheim, Deutschland) mit Ausnahme der Taq Polymerase (Perkin Elmer, NJ, USA) bezogen. Die Primer für die PCR-Amplifikation der H- und L-Ketten der Fab-Moleküle, der VCSM13 Helferphage und der Escherichia coli Stamm XL-Blue wurden von Stratacyte (La Jolla, CA, USA) bezogen. Das Phagemid pComb3 wurde vom Scripps Research Institute (La Jolla, CA, USA) bezogen. Die Klonierung, die Transformation in XL-Blue-Zellen und die Herstellung von Phabs erfolgte wie von Barbas III und Lerner, Methods: Companion Methods Enzymol. 2 (1991), 119) beschrieben. Die Phabs wurden mit 4% (w/v) Polyethylenglykol 8000 und 3% (w/v) NaCl präzipitiert und in PBS pH 7,4 resuspendiert. Die resultierende Expressionsbibliothek enthält 1×10^7 Spezifitäten.

1.6. Isolierung von GPIIb/IIIa-spezifischen Phabs

GPIIb/IIIa-spezifische Phabs wurden durch insgesamt 5 Runden einer Affinitätsselektion ("Panning") hergestellt. Nach Präabsorption (negative Selektion) mit 5×10^7 thrombasthenischen Plättchen wurden die Phabs mit 10^8 normalen Plättchen für 45 min inkubiert (positive Selektion). Gebundene Phabs wurden dann mit 0,05 mol/l Natriumcitrat pH 2,5 eluiert und mit 1 mol/l Tris-Puffer neutralisiert. Nach jeder "Panning"-Runde wurde die Anreicherung von GPIIb/IIIa spezifischen Phabs durch Titration der Phagenkolonie-bildenden Einheiten verfolgt. Nach fünf Selektionsrunden

wurde eine Anreicherung der eluierten Phabs um den Faktor von mehr als 100 gefunden.

5 Der nach der vierten Selektionsrunde erhaltene Pool von Phabs wurde näher auf seine GPIIb/IIIa Spezifität analysiert. Hierzu wurden 40 Phab-Klone zufällig ausgewählt und ihre Bindespezifität in einem Immunodot-Assay ermittelt. 1 μ l normale und thrombasthenische Plättchen (10^9 ml) sowie gereinigtes GPIIb/IIIa (500 μ g/ml) wurden auf Nitrozellulosestreifen (Millipore Corporation, Bedford, MA, USA) getropft. Die Streifen wurden in TBS mit 10 0,15% Casein (TBS-Casein) blockiert und dann über Nacht mit den in TBS-Casein verdünnten Phabs inkubiert. Nach drei Waschungen mit TBS-0,1% Tween 20 (TBS-Tween) wurden die gebundenen Phabs mit 4-Chlor-1- α -naphthol (Merck, Darmstadt, Deutschland) nach Inkubation mit Meerrettichperoxidase-konjugiertem polyklonalem Kaninchen-Anti-Phage-15 Antikörper (Vogel et al., supra) verdünnt 1:1000 in TBS-Casein nachgewiesen.

Die Bindung von Phabs an Plättchen und gereinigtes GPIIb/IIIa wurde auch nach Denaturierung der Proteine durch Erhitzen (70°C) oder durch 20 Säurebehandlung (pH 2 mit 0,5 N HCl) vor dem Auftropfen getestet.

Von den 40 zufällig ausgewählten Klonen reagierten 23 (57,5%) mit GPIIb/IIIa, während 17 keine Bindung zeigten. Nach Denaturierung des Antigens durch Hitze oder pH 2 vor der Inkubation wurde keine Bindung von 25 Anti-GPIIb/IIIa an Phabs beobachtet, wodurch gezeigt wird, daß intaktes GPIIb/IIIa für die Phab-Bindung notwendig ist. Fab-Bestimmung an negativen Phabs zeigte keine Fab-Moleküle bei 15 Klonen (88 %). Die zwei Fab-positiven Klone ohne Bindung an GPIIb/IIIa könnten eine geringe Bindeaffinität für GPIIb/IIIa aufweisen.

1.7. Fab Analyse

Zum Test der positiven Phabs auf kappa (κ), lambda (λ) und Fd-Ketten wurden die Anti-GPIIb/IIIa Phabs auf Nitrozellulose getropft. Die Filter wurden 4 Stunden lang mit Peroxidase-markiertem Maus-anti-Human- λ -, - κ - (The Binding Site Limited, Birmingham, England) und -Fd-Antikörper (aus der Myelomazelllinie HP6045, ATCC1757, Rockville, MD, USA) verdünnt 1:1000 in TBS-Casein inkubiert und mit Chemielumineszenz (ECL, Amersham, Schweiz, Zürich, Schweiz) entwickelt. Ein Test von 15 zufällig ausgewählten Anti-GPIIb/IIIa Fab-Klonen auf κ , λ und Fd-Ketten ergab das Vorhandensein einer Fd-Kette in 12 Klonen (80%) und der λ -Kette in allen Klonen.

Eine quantitative Bestimmung der Fab-Bindung an GPIIb/IIIa auf Plättchen erfolgt durch Präinkubation gepoolter Phabs mit Plättchen in verschiedenen Konzentrationen. Der Überstand wurde dann durch ein Immunodotverfahren analysiert. Dabei wurde festgestellt, daß 1 bis 3×10^4 Phabs pro Plättchen binden. Dies weist darauf hin, daß ungefähr 10 bis 50 % der GPIIb/IIIa Moleküle pro Plättchen durch Phabs besetzt werden können.

20

1.8. Charakterisierung der Phab-Bindeepitope

Die Epitopspezifität von Phabs wurde durch einen Inhibitionstest unter Verwendung verschiedener monoklonaler Antikörper (siehe Punkt 4) bestimmt. 1 μ l aufgetaute normale und thrombasthenische Plättchen (10^9 /ml), gereinigtes GPIIb/IIIa (500μ g/ml), ein Peptidfragment von GPIIIa (Aminosäuren 468-690, 500μ g/ml) und der cytoplasmatische Abschnitt von GPIIb/IIIa (500μ g/ml) wurden jeweils in Doppelansätzen auf Nitrozelulosestreifen aufgetropft. Nach der Blockierung wurden die Phab-Klone (0,4 μ g/ml Fab) über Nacht mit oder ohne monoklonalen Antikörper (1 μ g/ml) inkubiert. Die gebundenen Phabs wurden durch Peroxidase-markierten Anti-PHage-Antikörper und 4-Chlor-1- α -naphthol nachgewiesen.

30

Bei diesen Untersuchungen wurden 2 Gruppen von Phabklonen identifiziert. Gruppe A (5 Klone) wurde mäßig durch einen Pool aller Antikörper, aber stark durch GPIIb/IIIa-Komplex-spezifische Antikörper inhibiert. Anti-GPIIb Antikörper hatten keinen Effekt. Gruppe B (10 Klone) wurde vollständig
5 durch den Pool aller Antikörper, aber weniger durch den komplexspezifischen Antikörper und auch durch den IIb spezifischen Antikörper inhibiert. Keine Gruppe zeigte Reaktion mit GPIIIa spezifischen Antikörpern. Gleiche Ergebnisse wurden bei Verwendung von Plättchen oder gereinigtem GPIIb/IIIa als Antigen erhalten. Es wurde keine Phab-Bindung an das
10 cytoplasmatische Peptid oder das extrazelluläre Fragment von GPIIIa gefunden.

Eine Zusammenfassung dieser Ergebnisse ist in Tabelle 1 gezeigt.

Tabelle 1

Hemmung der Phab-Bindung (Mittelwert \pm SD in %)					
Pools monoklonaler Antikörper für Inhibition	Gruppe A Phab Klone (n=5)		Gruppe B Phab Klone (n=10)		
	Plättchen	Gereinigtes GPIIb/IIIa	Plättchen	Gereinigtes GPIIb/IIIa	
(1) Anti-GPIIb	0	0	49,1 \pm 5,9	49,4 \pm 9,2	
(2) Anti-GPIIIa	0	0	0	0	
(3) Anti GPIIb/IIIa-Komplex	77,8 \pm 2,9	43,6 \pm 2,1	58,6 \pm 4,4	45,5 \pm 8,0	
Pool aller Antikörper (1)-(3)	47,6 \pm 7,7	33,0 \pm 10,8	95,9 \pm 2,7	97,5 \pm 7,5	

1.9. Inhibierungsuntersuchungen

Die Blockierung der Bindung von Autoantikörpern aus Patienten an GPIIb/IIIa durch die gefundenen anti-GPIIb/IIIa Phabs wurde durch Inhibierungsuntersuchungen ermittelt. Hierzu wurden zwei der wie zuvor beschrieben identifizierten Phabklone (PDG16, PDG31) verwendet.

Serielle Verdünnungen von 1:3 bis 1:1000 der eluierten Autoantikörper aus Patienten wurden auf die Bindung an gereinigtes GPIIb/IIIa analysiert. Hierzu wurde ein Immunodotassay durchgeführt. 100 ng gereinigtes GPIIb/IIIa wurde in jeweils dreifachen Ansätzen auf Nitrozellulosestreifen getropft und die Filter mit TBS-Casein blockiert. Zur Blockierung der AITP Autoantikörper-Bindung an GPIIb/IIIa durch Phabs wurden die Streifen 1 h lang mit 10^{11} Phabs und anschließend 4 h lang mit AITP Autoantikörpern in variablen Verdünnungen inkubiert. Gebundene Autoantikörper wurden durch Peroxidase-markierten Anti-human-IgG-Fc Antikörper und ECL nachgewiesen.

Die Bindung von Autoantikörpern aus 8 AITP Patienten wurde durch Anti-GPIIb/IIIa Phabs inhibiert. Der Inhibierungsbereich war 10 bis 46 %, 32 bis 60 % und 20 bis 67 % für PTG16, PTG31 bzw. den Pool der beiden Phabs. Die Bindung von Autoantikörpern aus 4 AITP Patienten wurde durch diese Phabs nicht verändert. In beiden Gruppen waren Autoantikörper von Patienten mit primärer und krankheitsassoziierter AITP.

Eine Zusammenfassung der erhaltenen Ergebnisse ist in Tabelle 2 gezeigt.

Tabelle 2

	Hemmung der Bindung an gereinigtes GPIIb/IIIa durch (%)		
AITP-Patient	Phab-Klon PDG16	Phab-Klon PDG31	Pool beider Phab Klone
WS16	13	19	40
WS37	14	20	36
KC	24	22	28
KK	22	22	40
KP	10	36	60
WS2	25	55	65
KS	60	56	64
KL	0	15	10
KG	0	0	0
KM	0	0	0
KE	0	0	0
KR	0	0	0

1.10. DNA Sequenzanalyse

Plasmid DNA wurde aus vier Phabklonen der Gruppe A und 4 Klonen der Gruppe mit dem Nukleobond® AX Reinigungskit PC 20 (Macherey-Nagel AG, Oensingen, Schweiz) gereinigt.

Die Nukleinsäuresequenzierung erfolgte auf einen ABI373A Sequenziersystem unter Verwendung eines PRISM Ready Reaction DyeDeoxy Terminator Cycle Sequencing Kit. Die Primer wurden von Microsynth, Balgach, Schweiz bezogen. Zur Sequenzierung der H Kette wurden folgende Primer verwendet: Chy1 (5'-CGC TGT GCC CCC AGA GGT-3') und PCH (5'-GGC CGC AAA TTC TAT TTC AAG G-3'). Zur Sequenzierung der L-Kette wurden folgende Primer verwendet: Cλ (5'-GAG ACA CAC CAG TGT GGC-3'), Cκ (5'-CAC AAC AGA GGC AGT TCC-3') und PCL(5'-CTA AAC TAG CTA GTC TCC-3'). Die von der DNA Sequenz abgeleiteten Aminosäuresequenzen wurden mit der GenEMBL-Genbank verglichen und Stammlinien VH und Vλ Familien zugeordnet.

Die VH und Vλ Nukleotidsequenzen der 4 Phabklone jeder Gruppe (Gruppe A: PDG7, PDG8, PDG10, PDG16; Gruppe B: PDG13, PDG17, PDG31, PTG37) wurden durch automatisierte Sequenzierung analysiert und mit bekannten Stammlinien-Gensequenzen verglichen (Tabellen 3 und 4). Innerhalb jeder Gruppe war 100 % Homologie in den abgeleiteten Aminosäuresequenzen der H- und L-Ketten. Im Gegensatz dazu war die Homologie zwischen Gruppe A und B nur 36,9 % für die H-Kette und 81,9% für die L-Ketten-Aminosäuresequenzen.

In der H-Kette zeigen Klone der Gruppe A den höchsten Grad an Sequenzidentität mit dem Stammliniengen VH4.11 der V_H4 Familie (Sanz, et al. EMBO J. 8 (1989), 3741-3748). Es gab 7 Aminosäureunterschiede in der Frameworkregion (FR) und 8 in der Komplement-bestimmenden Region (CDR). Klone der Gruppe B unterschieden sich von der am meisten homologen Stammliniensequenz 1.9III der V_H3-Familie (Berman et al., EMBO J. 7 (1988), 727-738) durch vier Aminosäuren in FR und eine in CDR.

In der L-Kette zeigten die Klone der Gruppe A und B die höchste Homologie zu der Stammliniengensequenz der DPL2 der V_λ I Familie (Williams und Winter, Eur. J. Immunol. 23 (1993), 1456). Es gab neun Aminosäureun-

terschiede in FR und zehn in CDR für Klone der Gruppe A und einen in FR und zwei in CDR für Klone der Gruppe B. Die erhaltenen Ergebnisse sind in den Tabellen 3 und 4 zusammengefaßt.

Tabelle 3

A. Schwere Ketten

Klone	FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	CDR3	FR4
VH4.11	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSIS	SYVWS	WIRQPPGKGLEWIG	YIYSGSTNYPNPSLKS	RVTISVDTSKNQFSLKLSSTAAADTAAYYCAR	VLFPDPISHDV	HGKGTITVTSS
PDG7	--K-L--	G-S-R	--S--	D-S-----K-K--R-	---L---	VLFPDPISHDV	HGKGTITVTSS
PDG8	-----N-----R---	-----	-----	-----	-----	VLFPDPISHDV	HGKGTITVTSS
PDG10	-----	-----	-----	-----	-----	VLFPDPISHDV	HGKGTITVTSS
PDG16	-----	-----	-----	-----	-----	VLFPDPISHDV	HGKGTITVTSS
1.9111	QVQLVESGGGVQPGKSLRLSCAASGFTFS	SYGHH	WVRQAPGKGLEWVA	VISYDGSNKYYADSVKG	RFTISRDNKNTLYLQHNLSRAEDTAVYYCAK	ALGSHGGNDIYMDV	HGKGTITVTSS
PDG13	--K-L--	--A--	-----	-----	--A---	ALGSHGGNDIYMDV	HGKGTITVTSS
PDG17	-----	-----	-----	-----	-----	ALGSHGGNDIYMDV	HGKGTITVTSS
PDG31	-----	-----	-----	-----	-----	ALGSHGGNDIYMDV	HGKGTITVTSS
PDG37	-----	-----	-----	-----	-----	ALGSHGGNDIYMDV	HGKGTITVTSS
M85255	--Q-V--	-----	-----	-----	--T---	DRPIARNTYGGMDV	HGKGTITVTSS

B. Leichte Ketten

Klone	FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	CDR3	FR4
DPL2	VLTQPSASGTPGQRTISC	SGSSNIGSNTVN	WYQQLPGTAPKLLIY	SNNQRPS	GVPDRFSGSKGTSASLAI SGLQSEDEADYYC	AAWDDSLNG	FGGGTKLTVLQSP
PDG7	-V-----W-----	--R--P-S	--H-V--	GSH----	-----R-----G-AG--	-T---G---PV	FGGGTKLTVLQSP
PDG8	-----	-----	-----	-----	-----	-----	FGGGTKLTVLQSP
PDG10	-----	-----	-----	-----	-----	-----	FGGGTKLTVLQSP
PDG16	-----	-----	-----	-----	-----	-----	FGGGTKLTVLQSP
DPL2	VLTQPSASGTPGQRTISC	SGSSNIGSNTVN	WYQQLPGTAPKLLIY	SNNQRPS	GVPDRFSGSKGTSASLAI SGLQSEDEADYYC	AAWDDSLNG	FGGGTKLTVLQSP
PDG13	-V-----	-----	-----	-----	-----	-----HW	FGGGTKLTVLQSP
PDG17	-----	-----	-----	-----	-----	-----	FGGGTKLTVLQSP
PDG31	-----	-----	-----	-----	-----	-----	FGGGTKLTVLQSP
PDG37	-----	-----	-----	-----	-----	-----	FGGGTKLTVLQSP

FR: framework-Region; CDR: Komplement-bestimmende Region. Die oberen Sequenzen (VH4.11; 1.9111; DPL2) sind zu Vergleichszwecken angegeben und stellen die abgeleitete Aminosäuresequenz für die am nächsten verwandte veröffentlichte Stammlinien-Gensequenz dar. Striche bedeuten Identität. M85255 bezieht sich auf die EMPL/GenBank Kennzeichnungsnummer und bedeutet die abgeleitete Aminosäuresequenz des humanen Anti-GPIIb-Autoantikörpers 2E7 (Kunicki et al., J. Autoimmun. 4 (1991), 433-446). Für die schwere Kette sind die ersten drei Aminosäuren (QVK) durch die Vektorsequenz von pComb3 bestimmt.

Tabelle 4 zeigt die Zuordnung von Klonen der Gruppe A und B zu bekannten Stammlinien V-Gensequenzen nach der Aminosäurehomologie

5

10

15

	Schwere Kette			Leichte Kette		
PDG- Phab- Klone	V _H Familie	Stamm- liniengen	Homo- logie (%)	V _L Fa- milie	Stamm- liniengen	Homo- logie (5)
Gruppe A: 7,8, 10, 16	V _H 4	V _H 4.11	84,3	V _L I	DPL2	81,4
Gruppe B: 13, 17,31, 37	V _H 3	1,9III	95,1	V _L I	DPL2	97,1

2. Identifizierung von antiidiotypischen Antikörpersequenzen

20

Nach der in Beispiel 1 angegebenen Methode wurden durch die Phagemid-technik Sequenzen für antiidiotypische Antikörper identifiziert. Dabei wurde der in Beispiel 1 selektionierte Klon PDG16 als Antigen verwendet. Eine negative Vorselektion fand nicht statt.

25

Es wurde ein Pool von kombinatorischen Phab-Bibliotheken, die Spezifitäten einer nichtimmunen und einer mit roten Blutzellen immobilisierten Bibliothek peripherer B-Lymphozyten und einer nichtimmunen Bibliothek von B-Lymphozyten aus Tonsillen verwendet.

30

Der nach der vierten Panningrunde erhaltene Pool von Phabs wurde analysiert. Hierzu wurden 40 Phab-Klone zufällig ausgewählt und ihre

Bindespezifität ermittelt. 25 der ausgewählten Klone reagierten mit Anti-GPIIb/IIIa-Phab. Diese antiidiotypischen Phab-Klone gehörten zu zwei Gruppen: Gruppe I (drei Klone) zeigte eine Reaktion ausschließlich mit Autoantikörper-Phab-Klonen der Gruppe A (PDG 7, 8, 10 und 16), während
5 die Phab-Klone der Gruppe II (insgesamt 22 Klone) sowohl mit Phab-Klonen der Gruppen A und B, mit murinen monoklonalen Anti-GPIIb/IIIa-Antikörpern, mit gereinigtem Serumimmunglobulin (IVIgG) oder F(ab')₂ Fragmenten davon und mit Anti-IgE-Fab reagieren. 14 Phab-Klone (Gruppe III) reagierten mit keiner der genannten Substanzen. Ein Phab-Klon der Gruppe IV reagierte nur
10 mit Anti-GPIIb/IIIa Antikörpern. Die Ergebnisse dieser Spezifitätsuntersuchungen sind in Tabelle 5 zusammengefaßt.

Eine DNA-Sequenzanalyse von Phab-Klonen der Gruppe I (AI-X16, 17 und 24) zeigte in den für die schwere Kette kodierenden Sequenzen eine bis auf
15 eine Aminosäure in der CDR2 Region vollständige Identität und in den für die leichte Kette kodierenden Sequenzen eine vollständige Identität. Ein Vergleich mit bekannten Stammlinien-Gensequenzen zeigte ca. 85% Homologie zur H-Ketten-Sequenz VH3 und ca. 90% Homologie zur Sequenz der L-Kettenfamilie V- λ II. Von den Phab-Klonen der Gruppen II, III und IV
20 wurde eine DNA-Sequenzanalyse des H-Kettengens jeweils an einem Vertreter durchgeführt. Die Ergebnisse dieser Sequenzanalyse und des Vergleichs mit bekannten Stammlinien-Gensequenzen ist in den Tabellen 6 und 7 zusammengefaßt.

25 Das Ergebnis einer Inhibitionsuntersuchung ist in Fig. 1 dargestellt. Es wurde gefunden, daß der Phab AI-X17 (Gruppe I) die Bindung von Autoantikörper-Phabs der Gruppe A (PDG-X) an das Glykoprotein IIb/IIIa hemmen kann.

Tabelle 5

Bindung an

AIX	Phab-Klone	PDG _A	PDG _B	anti-IgE-Fab	anti-GPIIb/IIIa mAb	SG	F(ab') ₂
Gruppe I							
	16,17,24	3	+	-	-	-	-
Gruppe II							
	1,2,3,4,5,6,7,9, 11,13,14,23,26, 27,28,29,33,35, 36,37,38,40	22	+	+	+	+	+
Gruppe III							
	8,10,12,15,18, 19,21,22,25,30, 31,32,34,39	14	-	-	-	-	-
Gruppe IV							
	20	1	-	-	+	-	-

Tabelle 6

AIX Phab-Klone	H-Kette			L-Kette		
	V _H Familie	Stammlinien- gen	Homologie (%)	V _λ Familie	Stammlinien- gen	Homologie (%)
16, 24	V _H 3	DP47	88%	V _λ 2	DPL10	88%
17	V _H 3	DP47	87%	V _λ 2	DPL10	88%
20	V _H 4	DP71	81%		n.d.	
39	V _H 3	DP49	94%		n.d.	
40	V _H 3	DP31	95%		n.d.	

Tabelle 7

A. Schwere Ketten

Klone	FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	CDR3	FR4
DP47	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLS	SYAMS	WVRQAPGKGLEWVS	AISGGSGTYYADSVKG	RTTISRDN	VRDLGYRVLSTFTEDI	WGQGT
AIX16	Q-K-----H-----D	NE---	-----	G-L-L-H-----	---N-R-V-----	-----	KVTVSS
AIX24	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
AIX17	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
DP49	QVQLVESGGGVVQPGSLRLS	SYGMH	WVRQAPGKGLEWVA	VISYDGSNKYYADSVKG	RTTISRDN	DGRSGSYAREFDGMDV	WGQGT
AIX39	--K-L-----H-----	--T--	-----	L-----	--A-----	-----	TTVTVSS
DP31	EVQLVESGGGLVQPGSLRLS	DYAMH	WVRQAPGKGLEWVS	GISWNSGIGYADSVKG	RTTISRDN	HGSSVATYNAEDI	WGQGT
AIX40	Q-K-L-----	--L-	-----	--D-T-----	-----	-----	MTVSS
DP71	QVQLQESGPGLVKPSSETLS	SYWVS	WIRQPPGKGLEWIG	YIYYSGSTNYPNPSLKS	RVTISVDT	DADGDGFSPIYFPY	WGQGT
AIX20	--K-L-----DV--R	-H---	-L-----	F--DGR-RF-----R-	--SL-M-P-K-----G-----S-----	-----	PTVSS

B. Leichte Ketten

Klone	FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	CDR3	FR4
DP110	QSALTQPASVSGSPGQITISC	TGTSSDVGSYNLVS	WYQQHPGKAPKLMY	EVSKRPS	GVSNRFGSGKSGNTASLTISGLQAEDEADYYC	CSYAGSSTE	-----
AIX16	VV-----	---AI-N--F-P	-----	-G-----	-----E-----	---VH---N	-----
AIX24	-----	-----	-----	-----	-----	-----	WVEGGGKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSS
AIX17	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

FR: Framework-Region-; CDK: Komplement-bestimmende Region. Die oberen Sequenzen (DP47, DP49, DP31, DP71 und DPL10) sind zu Vergleichszwecken angegeben und stellen die am nächsten verwandte bekannte Stammliniensequenz dar. Striche bedeuten Identität. Für die schwere Kette sind die ersten drei Aminosäuren (QVD) durch die Vektorsequenz von pComb3 bestimmt.

3. Einfluß von Autoantikörper-Polypeptiden auf die Bindung von Fibrinogen an Blutplättchen

3.1 Methoden

5

Analyse der Fab-Bindung an EDTA-vorbehandelte Blutplättchen

10

Ein an Blutplättchen reiches Plasma wurde 30 min mit 10 mM EDTA inkubiert. Biotinylierte PDG-B und PDG-A Polypeptide wurden zugegeben und für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Die Bindung von PDG-A und PDG-B an Blutplättchen wurden mittels durchflußzytometrischer Analyse unter Verwendung von Phycoerythrin-markiertem Streptavidin gemessen.

Aggregationsexperimente

15

20

An Blutplättchen reiches Plasma ($250 \times 10^9/l$) wurde frisch hergestellt und unter 5% CO₂ gehalten. Das Plasma wurde durch unterschiedliche Verdünnungen an ADP (maximale Konzentration 410 μ M) in Abwesenheit oder in Gegenwart von PDG-A oder PDG-B (maximale Menge 10 μ g Fab) aktiviert. Die Aggregation wurde in einem Aggregometer Rodell 300BD-5 (Baxter AG, Düringen, CH) gemessen. In weiteren Experimenten wurde nach Zugabe von PDG-A oder PDG-B polyklonales Anti-Fab-Antiserum zu den aktivierten Plättchen gegeben.

25

Fibrinogen-Bindetest

30

Vertiefungen von ELISA-Platten wurden mit 0,5 μ g/ml GPIIb/IIIa beschichtet und mit 3,5% Rinderserumalbumin in Tris-gepufferter Salzlösung blockiert. Dann wurde Fibrinogen (Kabi Diagnostics, Stockholm, Schweden) in unterschiedlichen Konzentrationen (maximal 0,08 μ g/ml) in Abwesenheit oder in Gegenwart von PDG-A, PDG-B oder Anti-IgE Fab zur Kontrolle zugegeben (maximale Konzentrationen 23 μ g/ml). Das gebundene Fibrinogen wurde mit

Ratten-Anti-Humanfibrinogen-Antikörper, biotinyliertem Maus-Anti-Ratten-Antikörper und einem Konjugat aus Streptavidin und biotinylierter Meerrettichperoxidase (Amersham Pharmacia Biotech Europe GmbH, Dübendorf, CH) unter Verwendung eines ELISA-Easy-Ablesegeräts (EAR340AT, SLT-Instruments, Österreich) bei 405 nm gemessen.

Kompetitionsassay unter Verwendung des monoklonalen Antikörpers 7E3 und des Antikörperfragments ReoPro®

An Plättchen reiches Plasma ($230 \times 10^9/l$) wurde für 1,5 h mit PDG-B oder PDG-A (200 bzw. 400 $\mu g/ml$) mit oder ohne dem murinen monoklonalen Antikörper 7E3 oder dessen Fab-Fragment ReoPro® (Gesamtmenge an Fab im Bereich von 10^{14} bis 10^{10}) inkubiert. Nach Fixieren mit einem gleichen Volumen an 1 % Paraformaldehyd wurde die Bindung von PDG-B und PDG-A an Plättchen mittels durchflußzytometrischer Analyse unter Verwendung von Phycoerythrin-markiertem Streptavidin gemessen.

3.2 Ergebnisse

Die getesteten rekombinanten Anti-GPIIb/IIIa Fab Autoantikörperfragmente zeigen keine Bindung an Blutplättchen, die mit 10 mM EDTA vorbehandelt worden waren. Dies zeigt, daß die Autoantikörperfragmente nur ein in seiner Konformation intaktes Antigen erkennen (Fig. 2).

In Aggregationsexperimenten, bei denen an Plättchen angereichertes Plasma verwendet wurde, zeigten PDG-A oder PDG-B keine Hemmung der Aggregation. In einem Fibrinogenbindetest, bei dem die Fibrinogenkonzentration 10^4 bis 10^6 mal geringer als in Serum ist, wurde die Fibrinogenbindung durch PDG-A und PDG-B vollständig gehämmt (Fig. 3). Bei Verwendung von Anti-IgE Fab als Kontrolle, das durch ein ähnliches Anreicherungsprotokoll erhalten wurde, trat keine Hemmung auf. Diese Ergebnisse

zeigen, daß sowohl PDG-A als auch PDG-B eine starke Wechselwirkung mit der Fibrinogenbindestelle auf GPIIb/IIIa zeigen.

5 In Untersuchungen mit dem murinen monoklonalen Anti-GPIIb/IIIa Antikörper 7E3 und dessen kommerziell erhältlichen Fab-Fragment ReoPro®, die beide die Fibrinogenbindung an aktiviertes GPIIb/IIIa hemmen, wurde eine selektive und vollständige Hemmung der PDG-B Bindung an Blutplättchen gefunden (Figuren 4 bis 6). In Gegensatz dazu wurde die Bindung von PDG-A an Blutplättchen weder durch 7E3 noch durch ReoPro® signifikant
10 gehemmt.

Anspruch

1. Nukleinsäure, die für die schwere Kette eines humanen Antikörpers,
5 ein funktionelles Derivat oder ein Fragment davon kodiert und eine CDR3-Region umfaßt, ausgewählt aus:
- (a) einer für die Aminosäuresequenz:
V L P F D P I S M D V (I)
10 kodierenden Nukleotidsequenz,
- (b) einer für die Aminosäuresequenz:
A L G S W G G W D H Y M D V (II)
15 kodierenden Nukleotidsequenz,
- (c) einer Nukleotidsequenz, die für eine Aminosäuresequenz mit
einer Homologie von mindestens 80% zu einer Aminosäurese-
quenz aus (a) oder (b) kodiert und
- 20 (d) einer Nukleotidsequenz, die für eine Aminosäuresequenz mit
einer äquivalenten Bindefähigkeit an GPIIb/IIIa kodiert.
2. Nukleinsäure nach Anspruch 1, weiterhin umfassend eine CDR1-
Region ausgewählt aus:
- 25 (a) einer für die Aminosäuresequenz:
G Y S W R (III)
kodierenden Nukleotidsequenz,
- 30 (b) einer für die Aminosäuresequenz:
S Y A M H (IV)
kodierenden Nukleotidsequenz, und

- (c) einer Nukleotidsequenz, die für eine Aminosäuresequenz mit einer Homologie von mindestens 80% zu einer Aminosäuresequenz aus (a), oder (b) kodiert.

5 3. Nukleinsäure nach einem der Ansprüche 1 oder 2, weiterhin umfassend eine CDR2-Region, ausgewählt aus

- (a) einer für die Aminosäuresequenz:
DISYSGSTKYKPSLR S (V)
10 kodierenden Nukleotidsequenz,

- (b) einer für die Aminosäuresequenz:
VISYDGSNKYYADSVKG (VI)
15 kodierenden Nukleotidsequenz und

- (c) einer Nukleotidsequenz, die für eine Aminosäuresequenz mit einer Homologie von mindestens 80% zu einer Aminosäuresequenz aus (a) oder (b) kodiert.

20 4. Nukleinsäure, die für die leichte Kette eines humanen Antikörpers, ein funktionelles Derivat oder ein Fragment davon kodiert und eine CDR 3-Region umfaßt, ausgewählt aus:

- (a) einer für die Aminosäuresequenz:
25 ATWDDGLNGPV (VII)
kodierenden Nukleotidsequenz,

- (b) einer für die Aminosäuresequenz:
30 AAWDDSLNGWV (VIII)
kodierenden Nukleotidsequenz,

- (c) einer Nukleotidsequenz, die für eine Aminosäuresequenz mit einer Homologie von mindestens 80% zu einer Aminosäuresequenz aus (a) oder (b) kodiert, und
- 5 (d) einer Nukleotidsequenz, die für eine Aminosäuresequenz mit einer äquivalenten Bindefähigkeit an GPIIb/IIIa kodiert.
5. Nukleinsäure nach Anspruch 4, weiterhin umfassend eine CDR1-Region ausgewählt aus:
- 10 (a) einer für die Aminosäuresequenz:
S G S S S N I R S N P V S (IX)
kodierenden Nukleotidsequenz,
- 15 (b) einer für die Aminosäuresequenz:
S G S S S N I G S N T V N (X)
kodierenden Nukleotidsequenz, und
- 20 (c) einer Nukleotidsequenz, die für eine Aminosäuresequenz mit einer Homologie von mindestens 80% zu einer Aminosäuresequenz aus (a) oder (b) kodiert.
6. Nukleinsäure nach einem der Ansprüche 4 oder 5, weiterhin umfassend eine CDR2-Region ausgewählt aus:
- 25 (a) einer für die Aminosäuresequenz:
G S H Q R P S (XI)
kodierenden Nukleotidsequenz,
- 30 (b) einer für die Aminosäuresequenz:
S N N Q R P S (XIII)
kodierenden Nukleotidsequenz, und

- (c) einer Nukleotidsequenz, die für eine Aminosäuresequenz mit einer Homologie von mindestens 80% zu einer Aminosäuresequenz aus (a) oder (b) kodiert.

5 7. Nukleinsäure, die für die schwere Kette eines humanen Antikörpers, ein funktionelles Derivat oder ein Fragment davon kodiert und eine CDR3-Region umfaßt, ausgewählt aus:

10 (a) einer für die Aminosäuresequenz:
V R D L G Y R V L S T F T F D I (XIV)
kodierenden Nukleotidsequenz,

15 (b) einer für die Aminosäuresequenz:
D G R S G S Y A R F D G M D V (XV)
kodierenden Nukleotidsequenz,

20 (c) einer für die Aminosäuresequenz:
M G S S V V A T Y N A F D I (XVI)
kodierenden Nukleotidsequenz,

(d) einer für die Aminosäuresequenz:
D A D G D G F S P Y Y F P Y (XVII)
kodierenden Nukleotidsequenz,

25 (e) einer Nukleotidsequenz, die für eine Aminosäuresequenz mit einer Homologie von mindestens 80% zu einer Aminosäuresequenz aus (a), (b), (c) oder (d) kodiert und

30 (f) einer Nukleotidsequenz, die für eine Aminosäuresequenz mit einer äquivalenten Bindefähigkeit an Autoantikörper gegen GPIIb/IIIa kodiert.

8. Nukleinsäure nach Anspruch 7, weiterhin umfassend eine CDR1-oder/und CDR2-Region ausgewählt aus einer für die in Tab. 7 gezeigten Aminosäuresequenzen oder dazu mindestens 80% homologen Aminosäuresequenz kodierenden Nukleotidsequenz.
- 5
9. Nukleinsäure, die für die leichte Kette eines humanen Antikörpers, ein funktionelles Derivat oder ein Fragment davon kodiert und eine CDR 3-Region umfaßt, ausgewählt aus:
- 10
- (a) einer für die Aminosäuresequenz:
C S Y V H S S T N (XVIII)
kodierenden Nukleotidsequenz,
- 15
- (b) einer Nukleotidsequenz, die für eine Aminosäuresequenz mit einer Homologie von mindestens 80% zu einer Aminosäuresequenz aus (a) kodiert, und
- 20
- (c) einer Nukleotidsequenz, die für eine Aminosäuresequenz mit einer äquivalenten Bindefähigkeit an Autoantikörper gegen GPIIb/IIIa kodiert.
10. Nukleinsäure aus Anspruch 9, weiterhin umfassend eine CDR1-oder/und CDR2-Region ausgewählt aus einer für die in Tab. 7 gezeigten Aminosäuresequenzen oder dazu mindestens 80% homologen Aminosäuresequenz kodierenden Nukleotidsequenz.
- 25
11. Vektor,
dadurch gekennzeichnet,
daß er
- 30
- (a) mindestens eine Kopie einer Nukleinsäure nach einem der Ansprüche 1 bis 3 oder/und mindestens eine Kopie einer Nukleinsäure nach einem der Ansprüche 4 bis 6 enthält oder

- (b) mindestens eine Kopie einer Nukleinsäure nach Anspruch 7 oder 8 oder/und mindestens eine Kopie einer Nukleinsäure nach Anspruch 9 oder 10 enthält.

5 12. Zelle,

dadurch gekennzeichnet,

daß sie

- (a) eine Nukleinsäure nach einem der Ansprüche 1 bis 3 oder/und eine Nukleinsäure nach einem der Ansprüche 4 bis 6 oder

10 (b) eine Nukleinsäure nach Anspruch 7 oder 8 oder/und eine Nukleinsäure nach Anspruch 9 oder 10 exprimiert.

13. Polypeptid,

dadurch gekennzeichnet,

15 daß es

- (a) von einer Nukleinsäure nach einem der Ansprüche 1 bis 3 oder/und einer Nukleinsäure nach einem der Ansprüche 4 bis 6 oder

20 (b) von einer Nukleinsäure nach Anspruch 7 oder 8 oder/und einer Nukleinsäure nach Anspruch 9 oder 10 kodiert ist.

14. Polypeptid nach Anspruch 13,

dadurch gekennzeichnet,

25 daß es die variable Domäne der H-Kette oder/und die variable Domäne der L-Kette eines humanen Antikörpers umfaßt.

15. Polypeptid nach Anspruch 14,

dadurch gekennzeichnet,

30 daß es sowohl die variable Domäne der H-Kette als auch die variable Domäne der L-Kette umfaßt.

16. Polypeptid nach einem der Ansprüche 13 bis 15,
dadurch gekennzeichnet,
daß es mit einer Markierungsgruppe oder einem Toxin gekoppelt ist.
- 5 17. Antikörper gegen ein Polypeptid nach einem der Ansprüche 13 bis 16.
18. Antikörper nach Anspruch 17,
dadurch gekennzeichnet,
10 daß er gegen die CDR3-Region der schweren oder/und leichten Antikörperkette des Polypeptids gerichtet ist.
19. Pharmazeutische Zusammensetzung, die als aktive Komponente eine Nukleinsäure nach einem der Ansprüche 1 bis 10, einen Vektor nach
15 Anspruch 11, eine Zelle nach Anspruch 12, ein Polypeptid nach einem der Ansprüche 13 bis 16 oder einen Antikörper nach einem der Ansprüche 17 oder 18, gegebenenfalls zusammen mit anderen aktiven Komponenten sowie pharmazeutisch üblichen Hilfs-, Zusatz- oder Trägerstoffen enthält.
- 20 20. Verwendung einer Nukleinsäure nach einem der Ansprüche 1 bis 10 eines Vektors nach Anspruch 11, einer Zelle nach Anspruch 12, eines Polypeptids nach einem der Ansprüche 13 bis 16, eines Antikörpers nach Anspruch 17 oder 18 oder einer pharmazeutischen
25 Zusammensetzung nach Anspruch 19 zur Herstellung eines Mittels für die Diagnose oder für die Behandlung oder Prävention von AITP.
- 30 21. Verwendung einer Nukleinsäure nach einem der Ansprüche 1 bis 10, eines Vektors nach Anspruch 11, einer Zelle nach Anspruch 12, eines Polypeptids nach einem der Ansprüche 13 bis 16 oder einer pharmazeutischen Zusammensetzung nach Anspruch 19 zur

Herstellung eines Mittels zur Beeinflussung der Bindung von Fibrinogen an Blutplättchen.

- 5 22. Verwendung nach Anspruch 21 zur Herstellung eines Mittels für die Modulation der Blutgerinnung, insbesondere für die Auflösung von Thromben oder/und für die Prävention der Thrombenbildung.

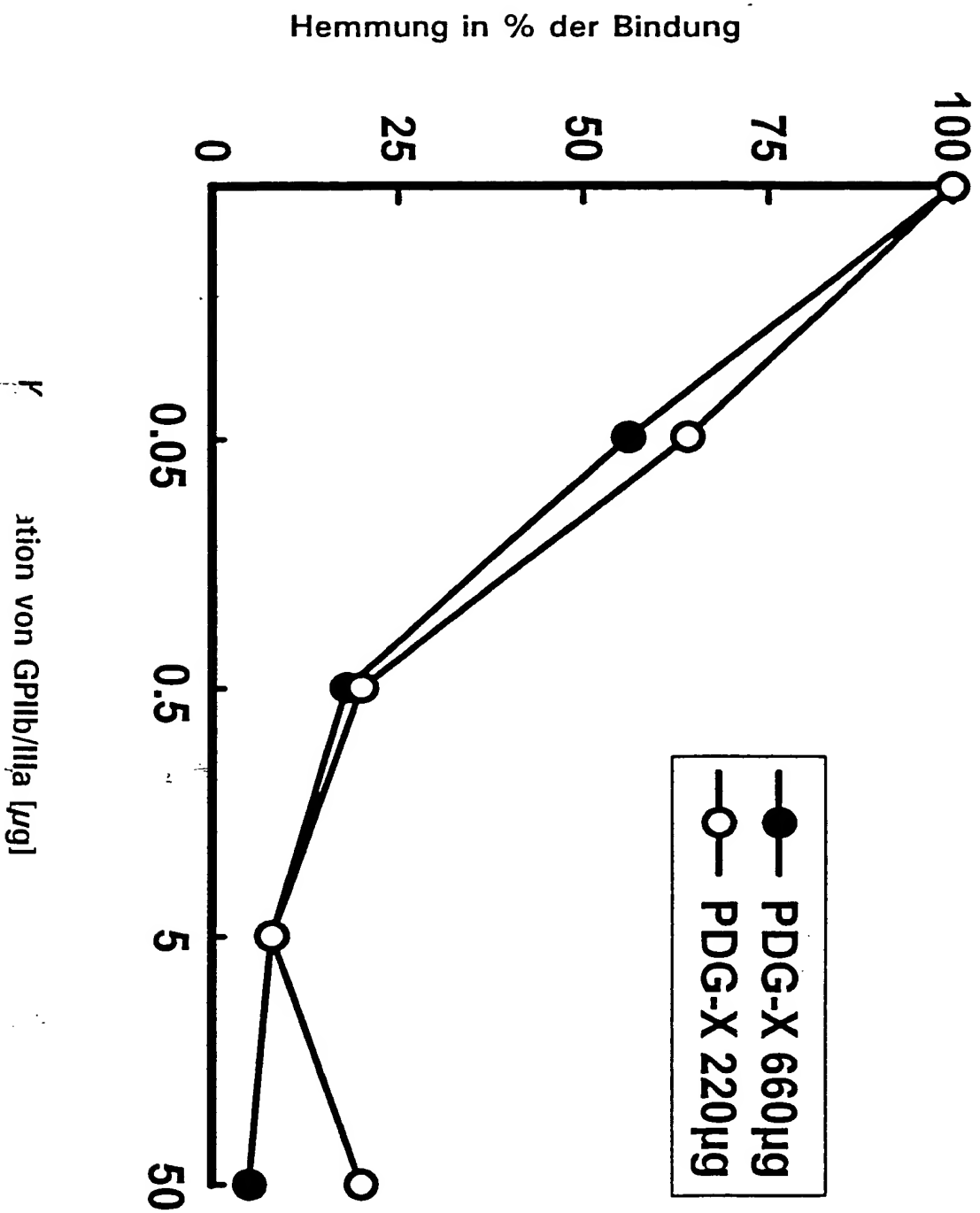
Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft neue Nukleinsäuresequenzen, die für humane
5 Autoantikörper und antiidiotypische Antikörper gegen Blutplättchen-
Membranproteine kodieren, neue Aminosäuresequenzen von humanen
Antikörpern und deren Verwendung für die Diagnostik und Therapie von
Krankheiten.

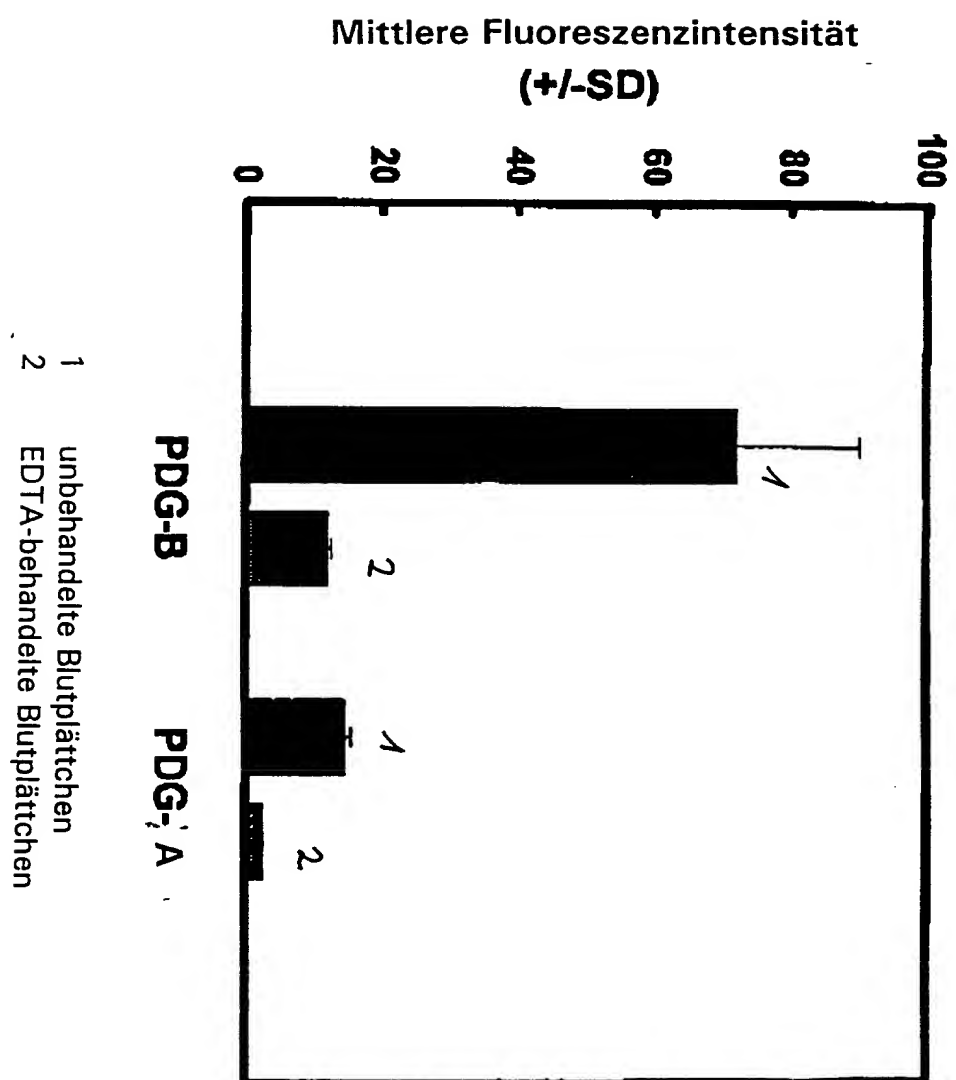
10

vo 06.05.98 09:52

Fig. 1

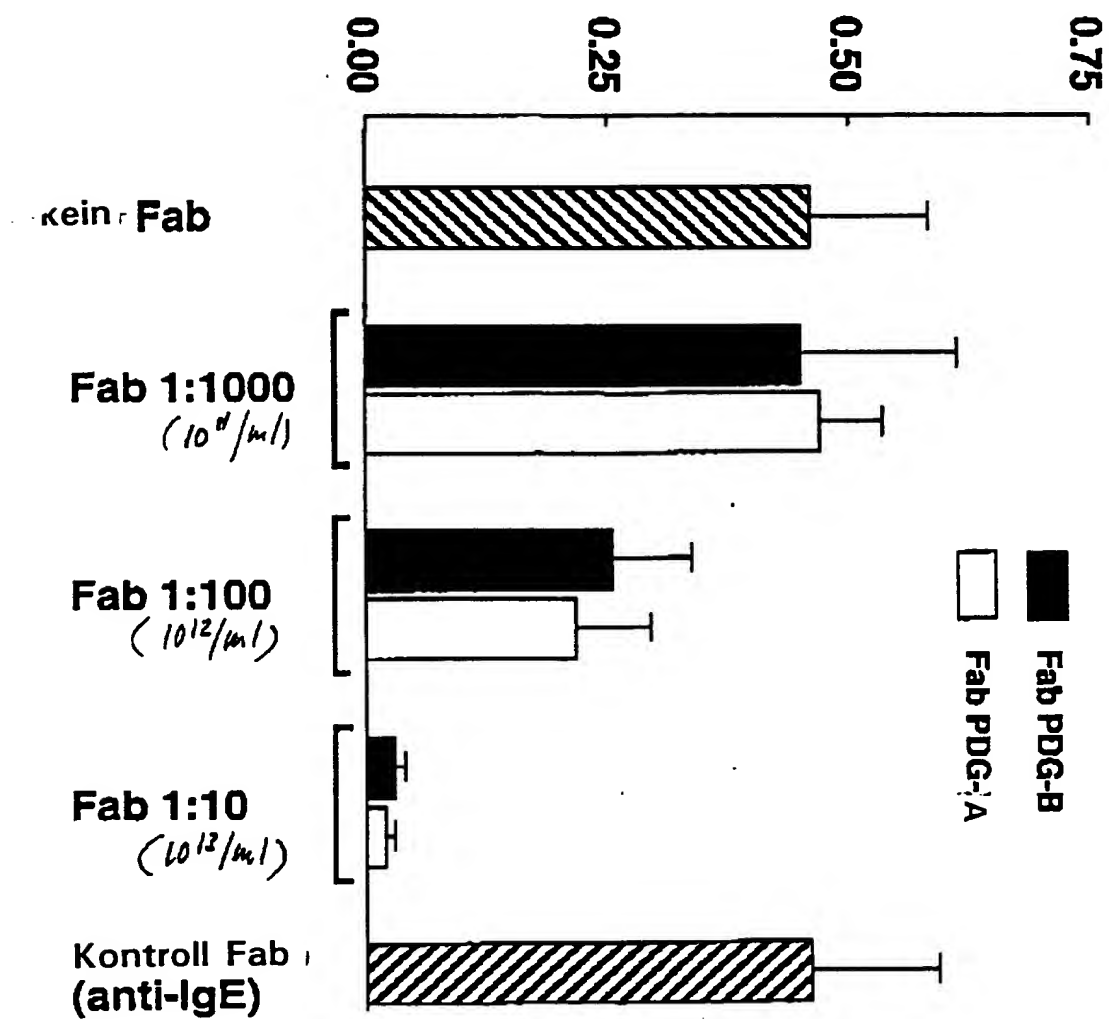


Figur 2

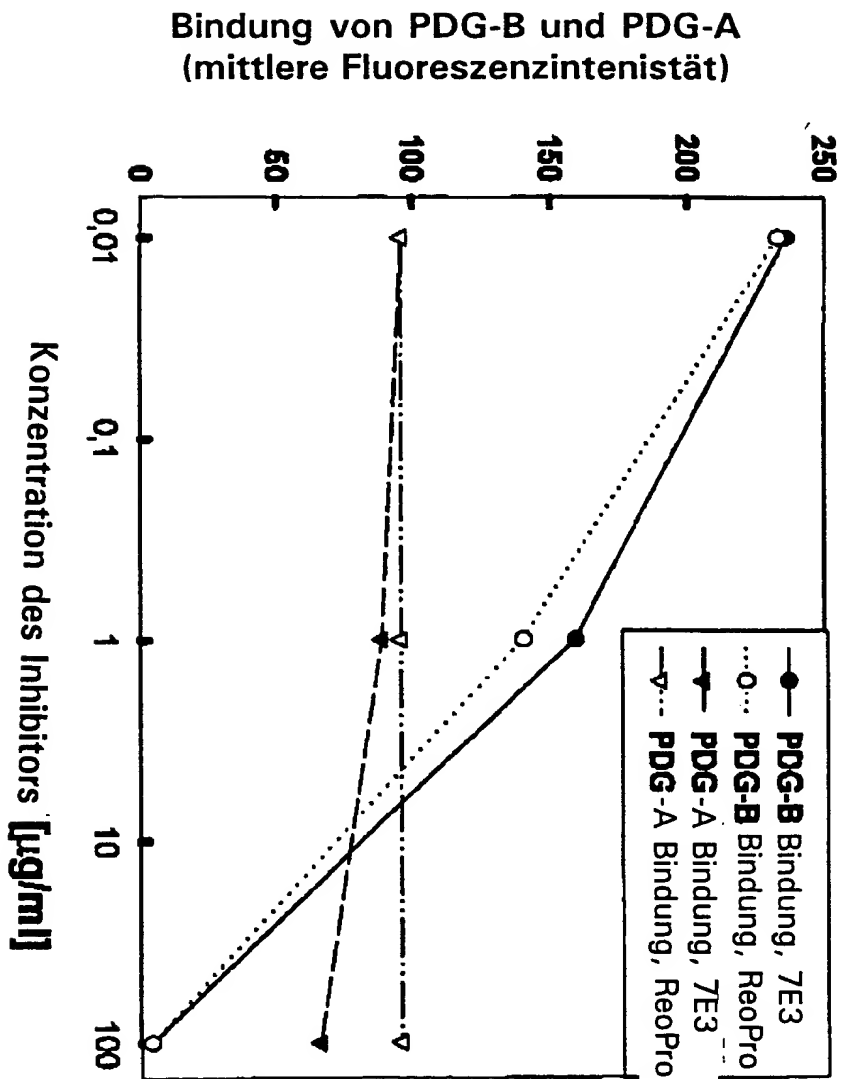


Figur 3

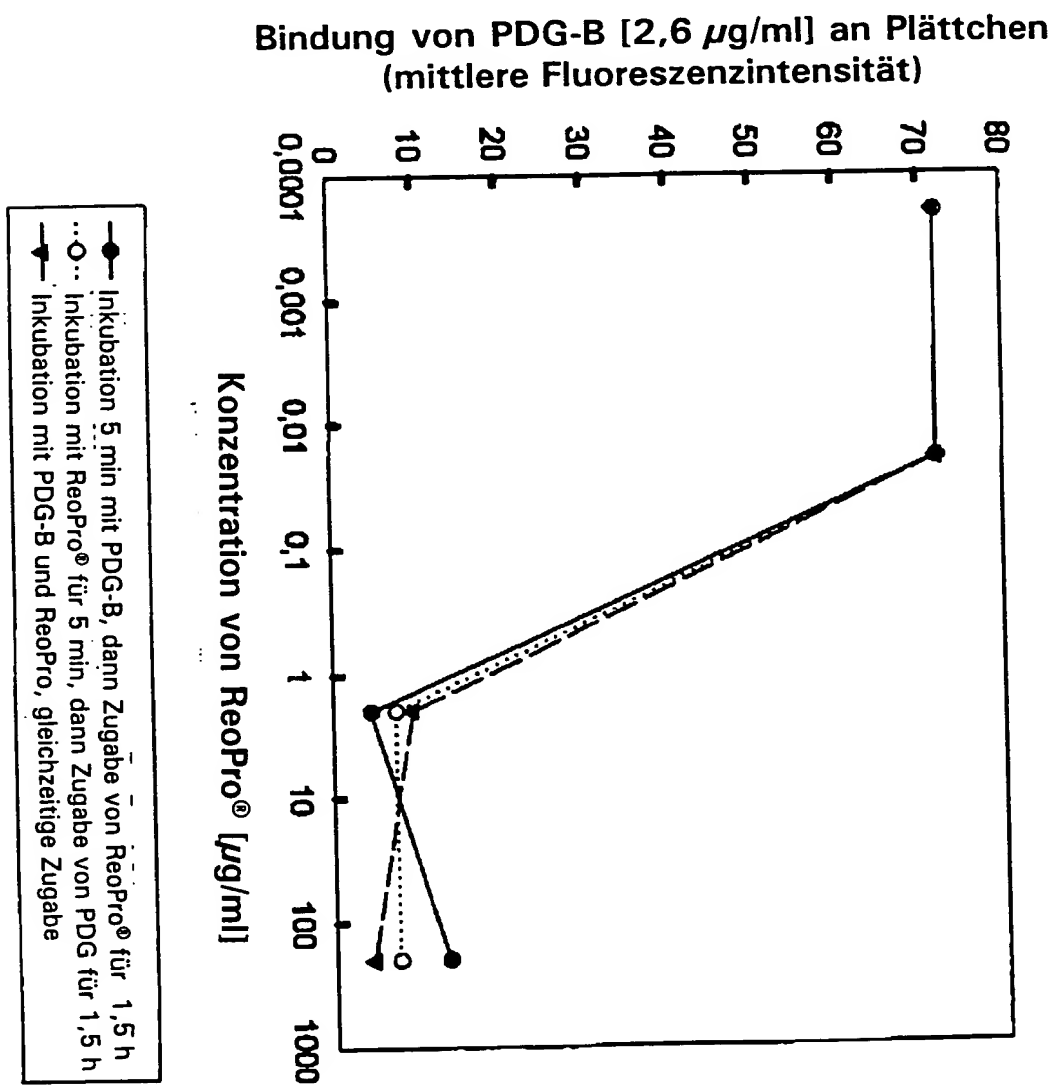
Fibrinogenbindung
(mittlere OD \pm SD)



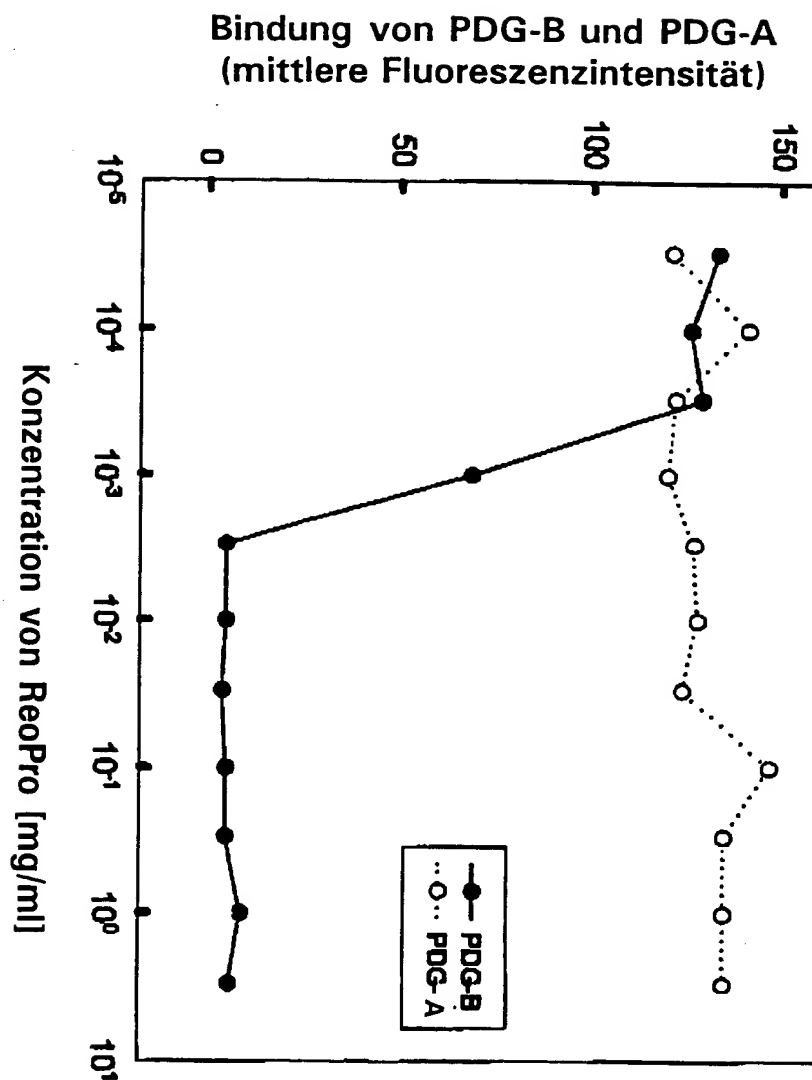
Figur 4



Figur 5



Figur 6



SEQUENZPROTOKOLL

(1) ALLGEMEINE ANGABEN:

(i) ANMELDER:

- (A) NAME: ASAT AG Applied Science & Technology
- (B) STRASSE: Baarerstrasse 77
- (C) ORT: Zug
- (E) LAND: CH
- (F) POSTLEITZAHL: 6302

(ii) BEZEICHNUNG DER ERFINDUNG: Rekombinante Antikoerper

(iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 18

(iv) COMPUTER-LESBARE FASSUNG:

- (A) DATENTRÄGER: Floppy disk
- (B) COMPUTER: IBM PC compatible
- (C) BETRIEBSSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
- (D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.30 (EPA)

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 1:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 357 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: beides
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS
- (B) LÄNGE: 1..357

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 1:

1	GTG AAA CTG CTC GAG TCG GGC CCA GGA CTG GTG AAG CCT TCG GAG	48
	Val Lys Leu Leu Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu	
	5 10 15	
	ACC CTG TCC CTC AAC TGC ACT GTC TCT GGT CGC TCC ATC AGT GGT TAC	96
	Thr Leu Ser Leu Asn Cys Thr Val Ser Gly Arg Ser Ile Ser Gly Tyr	
	20 25 30	
	TCT TGG AGA TGG ATC CGG CAG TCT CCA GGG AAG GGA CTA GAG TGG ATT	144
	Ser Trp Arg Trp Ile Arg Gln Ser Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile	
	35 40 45	
	GGG GAT ATC TCT TAT AGT GGG AGT ACC AAG TAC AAA CCC TCC CTC AGG	192
	Gly Asp Ile Ser Tyr Ser Gly Ser Thr Lys Tyr Lys Pro Ser Leu Arg	
	50 55 60	
	AGT CGA GTC ACC CTG TCA GTA GAC ACG TCC AAG AAC CAG TTC TCC CTG	240
	Ser Arg Val Thr Leu Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu	

(ix) MERKMAL:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS

(B) LÄNGE: 1..333

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 3:

GTG	GTG	ACT	CAG	CCA	CCC	TCA	GCG	TCT	GGG	ACC	CCC	GGG	CAG	TGG	GTC	48
Val	Val	Thr	Gln	Pro	Pro	Ser	Ala	Ser	Gly	Thr	Pro	Gly	Gln	Trp	Val	
120					125					130					135	
ACC	ATC	TCT	TGT	TCT	GGG	AGC	AGC	TCC	AAC	ATC	AGA	AGT	AAT	CCT	GTT	96
Thr	Ile	Ser	Cys	Ser	Gly	Ser	Ser	Ser	Asn	Ile	Arg	Ser	Asn	Pro	Val	
				140					145					150		
AGC	TGG	TAT	CAC	CAG	GTC	CCA	GGC	ACG	GCC	CCC	AAA	CTC	CTC	ATC	TTT	144
Ser	Trp	Tyr	His	Gln	Val	Pro	Gly	Thr	Ala	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile	Phe	
			155					160					165			
AGT	CAT	CAG	CGG	CCC	TCA	GGG	GTC	CCT	GAC	CGA	TTC	TCT	GGC	TCC		192
Ser	His	Gln	Arg	Pro	Ser	Gly	Val	Pro	Asp	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser		
	170					175					180					
AAG	TCG	GGC	ACC	TCC	GCC	TCC	CTG	GCC	ATC	CGT	GGG	CTC	CAA	TCT	GGG	240
Lys	Ser	Gly	Thr	Ser	Ala	Ser	Leu	Ala	Ile	Arg	Gly	Leu	Gln	Ser	Gly	
	185					190					195					
GAT	GCT	GGT	GAC	TAT	TAC	TGT	GCA	ACA	TGG	GAT	GAC	GGC	CTC	AAT	GGT	288
Asp	Ala	Gly	Asp	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Thr	Trp	Asp	Asp	Gly	Leu	Asn	Gly	
200					205					210					215	
CCG	GTG	TTC	GGC	GGA	GGG	ACC	AAG	CTG	ACC	GTC	CTA	AGT	CAG	CCC		333
Pro	Val	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Leu	Thr	Val	Leu	Ser	Gln	Pro		
			220						225					230		

'2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 4:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 111 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 4:

Val	Val	Thr	Gln	Pro	Pro	Ser	Ala	Ser	Gly	Thr	Pro	Gly	Gln	Trp	Val
1				5					10					15	
Thr	Ile	Ser	Cys	Ser	Gly	Ser	Ser	Ser	Asn	Ile	Arg	Ser	Asn	Pro	Val
			20					25					30		
Ser	Trp	Tyr	His	Gln	Val	Pro	Gly	Thr	Ala	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile	Phe
		35					40					45			
Gly	Ser	His	Gln	Arg	Pro	Ser	Gly	Val	Pro	Asp	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser
50						55					60				

Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Arg Gly Leu Gln Ser Gly
65 70 75 80
Asp Ala Gly Asp Tyr Tyr Cys Ala Thr Trp Asp Asp Gly Leu Asn Gly
85 90 95
Pro Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Ser Gln Pro
100 105 110

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 5:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
(A) LÄNGE: 369 Basenpaare
(B) ART: Nucleotid
(C) STRANGFORM: beides
(D) TOPOLOGIE: linear

- (ix) MERKMAL:
(A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS
(B) LÄNGE: 1..369

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 5:

CAG GTG AAA CTG CTC GAG TCT GGG GGA GGC GTG GTC CAG CCT GGG AGG	48
Gln Val Lys Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg	
115 120 125	
TCC CTG AGA CTC TCC TGT GCA GCC TCT GGA TTC ACC TTC AGT AGC TAT	96
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr	
130 135 140	
GCT ATG CAC TGG GTC CGC CAG GCT CCA GGC AAG GGG CTG GAG TGG GTG	144
Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val	
145 150 155	
GTT ATA TCA TAT GAT GGA AGC AAT AAA TAC TAC GCA GAC TCC GTG	192
Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val	
165 170 175	
AAG GGC CGA TTC GCC ATC TCC AGA GAC AAT TCC AAG AAC ACG CTG TAT	240
Lys Gly Arg Phe Ala Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr	
180 185 190	
CTG CAA ATG AAC AGC CTG AGA GCT GAG GAC ACG GCT GTG TAT TAC TGT	288
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys	
195 200 205	
GCG AGA GCG CTG GGG AGC TGG GGG GGT TGG GAC CAC TAC ATG GAC GTC	336
Ala Arg Ala Leu Gly Ser Trp Gly Gly Trp Asp His Tyr Met Asp Val	
210 215 220	
TGG GGC AAA GGG ACC ACG GTC ACC GTC TCC TCA	369
Trp Gly Lys Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser	
225 230	

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 6:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 123 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 6:

Gln	Val	Lys	Leu	Leu	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Val	Val	Gln	Pro	Gly	Arg	
1				5					10					15		
Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	Ser	Tyr	
			20					25					30			
Met	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val		
	35					40					45					
Ala	Ile	Ser	Tyr	Asp	Gly	Ser	Asn	Lys	Tyr	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val		
50					55					60						
Lys	Gly	Arg	Phe	Ala	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ser	Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr	
65					70					75					80	
Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	
			85						90					95		
Ala	Arg	Ala	Leu	Gly	Ser	Trp	Gly	Gly	Trp	Asp	His	Tyr	Met	Asp	Val	
			100					105					110			
Trp	Gly	Lys	Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ser						
	115						120									

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 7:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 333 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: beides
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS
- (B) LÄNGE: 1..333

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 7:

GTG	GTG	ACT	CAG	CCA	CCC	TCA	GCG	TCT	GGG	ACC	CCC	GGG	CAG	AGG	GTC	48
Val	Val	Thr	Gln	Pro	Pro	Ser	Ala	Ser	Gly	Thr	Pro	Gly	Gln	Arg	Val	
125						130					135					
ACC	ATC	TCT	TGT	TCT	GGA	AGC	AGC	TCC	AAC	ATC	GGA	AGT	AAT	ACT	GTA	96

Thr 140	Ile	Ser	Cys	Ser	Gly 145	Ser	Ser	Ser	Asn	Ile 150	Gly	Ser	Asn	Thr	Val 155	
AAC Asn	TGG Trp	TAC Tyr	CAG Gln	CAG Gln	CTC Leu	CCA Pro	GGA Gly	ACG Thr	GCC Ala	CCC Pro	AAA Lys	CTC Leu	CTC Leu	ATC Ile	TAT Tyr	144
AGT Ser	AAT Asn	AAT Asn	CAG Gln	CGG Arg	CCC Pro	TCA Ser	GGG Gly	GTC Val	CCT Pro	GAC Asp	CGA Arg	TTC Phe	TCT Ser	GGC Gly	TCC Ser	192
AAG Lys	TCT Ser	GGC Gly	ACC Thr	TCA Ser	GCC Ala	TCC Ser	CTG Leu	GCC Ala	ATC Ile	AGT Ser	GGG Gly	CTC Leu	CAG Gln	TCT Ser	GAG Glu	240
GAT Asp	GAG Glu	GCT Ala	GAT Asp	TAT Tyr	TAC Tyr	TGT Cys	GCA Ala	GCA Ala	TGG Trp	GAT Asp	GAC Asp	AGC Ser	CTG Leu	AAT Asn	GGT Gly	288
GTG Val	TTC Phe	GGC Gly	GGA Gly	GGG Gly	ACC Thr	AAG Lys	CTG Leu	ACC Thr	GTC Val	CTA Leu	GGT Gly	CAG Gln	CCC Pro			333

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 8:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 111 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 8:

Val 1	Val	Thr	Gln	Pro	Pro	Ser	Ala	Ser	Gly 10	Thr	Pro	Gly	Gln	Arg	Val 15
Thr	Ile	Ser	Cys	Ser	Gly	Ser	Ser	Ser	Asn	Ile	Gly	Ser	Asn	Thr	Val 20
Trp	Tyr	Gln	Gln	Leu	Pro	Gly	Thr	Ala	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile	Tyr	
Ser	Asn	Asn	Gln	Arg	Pro	Ser	Gly	Val	Pro	Asp	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser
Lys	Ser	Gly	Thr	Ser	Ala	Ser	Leu	Ala	Ile	Ser	Gly	Leu	Gln	Ser	Glu
Asp	Glu	Ala	Asp	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Ala	Trp	Asp	Asp	Ser	Leu	Asn	Gly
Trp	Val	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Leu	Thr	Val	Leu	Gly	Gln	Pro	

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 9:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 369 Basenpaare
 (B) ART: Nucleotid
 (C) STRANGFORM: beides
 (D) TOPOLOGIE: linear

(ix) MERKMAL:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS
 (B) LÄGE: 1..369

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 9:

CAG	GTG	AAA	CTG	CTC	GAG	TCT	GGG	GGA	GGC	TTG	GTT	CAC	CCC	GGG	GGG		48
Gln	Val	Lys	Leu	Leu	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	His	Pro	Gly	Gly		
			115					120					125				
	CTG	AGA	CTC	TCT	TGT	GCA	GCC	TCT	GGA	TTT	ACG	TTT	GAC	AAC	TTT		96
	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Asp	Asn	Phe		
		130					135					140					
	ATG	AGC	TGG	GTC	CGC	CAG	GCT	CCA	GGG	AAG	GGG	CTG	GAG	TGG	GTC		144
Ala	Met	Ser	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val		
	145					150					155						
TCA	GGC	ATT	AGT	GGT	GGT	GGT	CTT	TTG	ACA	CAC	TAC	GCA	GAC	TCC	GTG		192
Ser	Gly	Ile	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Leu	Thr	His	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val		
160					165					170					175		
AAG	GGC	CGG	TTC	ACC	ATC	TCC	AGA	AAC	AAT	TCC	AGG	AAC	ACT	GTA	TAC		240
Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asn	Asn	Ser	Arg	Asn	Thr	Val	Tyr		
			180						185					190			
CTA	CAA	ATG	AAC	AGC	CTG	AGA	GCC	GAA	GAC	ACG	GCC	GTG	TAT	TAT	TGT		288
Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys		
			195					200					205				
	AGA	GAT	CTG	GGC	TAT	AGA	GTA	CTT	TCG	ACT	TTT	ACT	TTT	GAT	ATC		336
	Arg	Asp	Leu	Gly	Tyr	Arg	Val	Leu	Ser	Thr	Phe	Thr	Phe	Asp	Ile		
		210					215					220					
TGG	GGC	CAG	GGG	ACA	AAG	GTC	ACC	GTC	TCT	TCA							369
Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Val	Thr	Val	Ser	Ser							
	225					230											

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 10:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 123 Aminosäuren
 (B) ART: Aminosäure
 (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 10:

Gln Val Lys Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val His Pro Gly Gly

1	5	10	15
Ser Leu Arg	Leu Ser Cys Ala Ala	Ser Gly Phe Thr Phe	Asp Asn Phe
	20	25	30
Ala Met Ser	Trp Val Arg Gln Ala	Pro Gly Lys Gly	Leu Glu Trp Val
	35	40	45
Ser Gly Ile	Ser Gly Gly Gly	Leu Leu Thr His	Tyr Ala Asp Ser Val
	50	55	60
Lys Gly Arg	Phe Thr Ile Ser Arg	Asn Asn Ser Arg	Asn Thr Val Tyr
	65	70	75
Leu Gln Met	Asn Ser Leu Arg Ala	Glu Asp Thr Ala	Val Tyr Tyr Cys
	85	90	95
Val Arg Asp	Leu Gly Tyr Arg Val	Leu Ser Thr Phe	Thr Phe Asp Ile
	100	105	110
Gly Gln Gly	Thr Lys Val Thr	Val Ser Ser	
	115	120	

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 11:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 375 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: beides
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS
- (B) LÄNGE: 1..375

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 11:

GTG ACT CAG CCT GCC TCC GTG TCT GGG TCT CCT GGA CAG TCG ATC	48
Val Thr Gln Pro Ala Ser Val Ser Gly Ser Pro Gly Gln Ser Ile	
125 130 135	
ACC ATC TCC TGC ACT GGA ACC AGC AGT GCT ATT GGG AAT TAT AAC TTT	96
Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Ser Ala Ile Gly Asn Tyr Asn Phe	
140 145 150 155	
GTC CCC TGG TAC CAA CAG CAC CCA GGC AAA GCC CCC AAA CTC ATG ATT	144
Val Pro Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Met Ile	
160 165 170	
TAT GAG GGC AGT AAG CGG CCC TCA GGG GTT TCT AAT CGC TTC TCT GGC	192
Tyr Glu Gly Ser Lys Arg Pro Ser Gly Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly	
175 180 185	
TCC AAG TCT GGC AAC ACG GCC TCC CTG ACA ATC TCT GGG CTC CAG GCT	240
Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu Gln Ala	

190					195					200						
GAG	GAC	GAG	GCT	GAG	TAT	TAC	TGC	TGC	TCA	TAT	GTT	CAT	AGT	AGC	ACT	288
Glu	Asp	Glu	Ala	Glu	Tyr	Tyr	Cys	Cys	Ser	Tyr	Val	His	Ser	Ser	Thr	
205					210					215						
AAT	TGG	GTG	TTC	GGC	GGA	GGG	ACC	AAG	CTG	ACC	GTC	CTA	GGT	CAG	CCC	336
Asn	Trp	Val	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Leu	Thr	Val	Leu	Gly	Gln	Pro	
220					225					230					235	
AAG	GCT	GCC	CCC	TCG	GTC	ACT	CTG	TTC	CCA	CCC	TCC	TCT				375
Lys	Ala	Ala	Pro	Ser	Val	Thr	Leu	Phe	Pro	Pro	Ser	Ser				
240					245											

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 12:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 125 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 12:

Val	Val	Thr	Gln	Pro	Ala	Ser	Val	Ser	Gly	Ser	Pro	Gly	Gln	Ser	Ile
1				5					10				15		
Thr	Ile	Ser	Cys	Thr	Gly	Thr	Ser	Ser	Ala	Ile	Gly	Asn	Tyr	Asn	Phe
			20					25					30		
Val	Pro	Trp	Tyr	Gln	Gln	His	Pro	Gly	Lys	Ala	Pro	Lys	Leu	Met	Ile
		35					40					45			
Tyr	Glu	Gly	Ser	Lys	Arg	Pro	Ser	Gly	Val	Ser	Asn	Arg	Phe	Ser	Gly
	50					55					60				
er	Lys	Ser	Gly	Asn	Thr	Ala	Ser	Leu	Thr	Ile	Ser	Gly	Leu	Gln	Ala
					70					75					80
Asp	Glu	Ala	Glu	Tyr	Tyr	Cys	Cys	Ser	Tyr	Val	His	Ser	Ser	Thr	
			85					90					95		
Asn	Trp	Val	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Leu	Thr	Val	Leu	Gly	Gln	Pro
			100					105					110		
Lys	Ala	Ala	Pro	Ser	Val	Thr	Leu	Phe	Pro	Pro	Ser	Ser			
		115					120					125			

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 13:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 366 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: beides
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ix) MERKMAL:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS

(B) LÄNGE: 1..366

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 13:

CAG	GTG	AAA	CTG	CTC	GAG	TCA	GGA	CCA	GGA	CTG	GTG	AAG	CCC	TCG	GAG	48
Gln	Val	Lys	Leu	Leu	Glu	Ser	Gly	Pro	Gly	Leu	Val	Lys	Pro	Ser	Glu	
			130						135					140		
ACC	CTG	TCT	CTC	ACC	TGC	ACT	GTC	TCT	GAT	GTC	TCC	ATC	AGA	AGT	CAT	96
Thr	Leu	Ser	Leu	Thr	Cys	Thr	Val	Ser	Asp	Val	Ser	Ile	Arg	Ser	His	
			145					150					155			
TAC	TGG	AGT	TGG	CTC	CGG	CAG	CCC	CCA	GGG	AAG	GGA	CTG	GAG	TGG	ATT	144
Trp	Trp	Ser	Trp	Leu	Arg	Gln	Pro	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Ile	
		160					165					170				
PTT	ATC	TAT	GAC	GGT	GCG	AGA	ACC	AGG	TTC	AAC	CCC	TCC	CTC	AGG		192
Phe	Ile	Tyr	Asp	Gly	Ala	Arg	Thr	Arg	Phe	Asn	Pro	Ser	Leu	Arg		
175					180					185						
AGT	CGA	GTC	TCC	CTT	TCA	ATG	GAC	CCA	TCC	AAG	AAG	CAG	TTT	TCC	CTG	240
Ser	Arg	Val	Ser	Leu	Ser	Met	Asp	Pro	Ser	Lys	Lys	Gln	Phe	Ser	Leu	
190					195					200					205	
AAA	CTG	GGG	TCT	GTG	ACC	GCT	GCG	GAC	TCG	GCC	GTC	TAC	TAC	TGT	GCG	288
Lys	Leu	Gly	Ser	Val	Thr	Ala	Ala	Asp	Ser	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	
			210					215						220		
AGA	GAC	GCG	GAT	GGA	GAT	GGC	TTC	AGC	CCA	TAC	TAC	TTT	CCC	TAC	TGG	336
Arg	Asp	Ala	Asp	Gly	Asp	Gly	Phe	Ser	Pro	Tyr	Tyr	Phe	Pro	Tyr	Trp	
			225					230					235			
GGC	CAG	GGA	ATC	CCG	GTC	TCC	GTC	TCC	TCG							366
Gly	Gln	Gly	Ile	Pro	Val	Ser	Val	Ser	Ser							
		240					245									

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 14:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 122 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 14:

Gln	Val	Lys	Leu	Leu	Glu	Ser	Gly	Pro	Gly	Leu	Val	Lys	Pro	Ser	Glu	
1				5					10					15		
Thr	Leu	Ser	Leu	Thr	Cys	Thr	Val	Ser	Asp	Val	Ser	Ile	Arg	Ser	His	
			20					25				30				
Tyr	Trp	Ser	Trp	Leu	Arg	Gln	Pro	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Ile	

35	40	45
Gly Phe Ile Tyr Asp Gly Ala Arg Thr Arg Phe Asn Pro Ser Leu Arg		
50	55	60
Ser Arg Val Ser Leu Ser Met Asp Pro Ser Lys Lys Gln Phe Ser Leu		
65	70	75
Lys Leu Gly Ser Val Thr Ala Ala Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala		
85	90	95
Arg Asp Ala Asp Gly Asp Gly Phe Ser Pro Tyr Tyr Phe Pro Tyr Trp		
100	105	110
Gly Gln Gly Ile Pro Val Ser Val Ser Ser		
115	120	

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 15:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 372 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: beides
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS
- (B) LÄNGE: 1..372

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 15:

CAG GTG AAA CTG CTC GAG TCT GGG GGA GGC GTG GTC CAC CCT GGG AGG	48
Gln Val Lys Leu Leu Glu Ser Gly Gly Val Val His Pro Gly Arg	
125	130
ACC CTG AGA CTC TCC TGT GCA GCC TCT GGA TTC ACC TTC AGT AGC TAT	96
Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr	
140	145
ACT ATG CAC TGG GTC CGC CAG GCT CCA GGC AAG GGG CTG GAG TGG GTG	144
Thr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val	
155	160
GCA CTT ATA TCA TAT GAT GGA AGC AAT AAA TAC TAC GCA GAC TCC GTG	192
Ala Leu Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val	
175	180
AAG GGC CGA TTC GCC ATC TCC AGA GAC AAT TCC AAG AAC ACG CTA TAT	240
Lys Gly Arg Phe Ala Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr	
190	195
CTG CAA ATG AAC AGC CTG AGA GCT GAG GAC ACG GCT GTG TAT TAC TGT	288
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys	
205	210
	215

GCG	AAA	GAT	GGC	CGG	AGT	GGG	AGC	TAC	GCC	AGG	TTC	GAC	GGT	ATG	GAC	336
Ala	Lys	Asp	Gly	Arg	Ser	Gly	Ser	Tyr	Ala	Arg	Phe	Asp	Gly	Met	Asp	
220						225					230					

GTC	TGG	GGC	CAA	GGG	ACC	ACG	GTC	ACC	GTC	TCC	TCA					372
Val	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ser					
235					240					245						

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 16:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 124 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 16:

Val	Lys	Leu	Leu	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Val	Val	His	Pro	Gly	Arg		
			5					10					15			
Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	Ser	Tyr	
			20					25					30			
Thr	Met	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val	
		35					40					45				
Ala	Leu	Ile	Ser	Tyr	Asp	Gly	Ser	Asn	Lys	Tyr	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val	
		50				55					60					
Lys	Gly	Arg	Phe	Ala	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ser	Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr	
		65			70					75					80	
Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	
			85					90						95		
Ala	Lys	Asp	Gly	Arg	Ser	Gly	Ser	Tyr	Ala	Arg	Phe	Asp	Gly	Met	Asp	
			100					105					110			
Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ser						
			115			120										

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 17:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 372 Basenpaare

(B) ART: Nucleotid

(C) STRANGFORM: beides

(D) TOPOLOGIE: linear

(ix) MERKMAL:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS

(B) LÄNGE: 1..372

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 17:

CAG	GTG	AAA	CTG	CTC	GAG	TCT	GGG	GGA	GGC	TTG	GTA	CAG	CCT	GGC	AGG	48
Gln	Val	Lys	Leu	Leu	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Arg	
125					130					135					140	
TCC	CTG	AGA	CTC	TCC	TGT	GCA	GCC	TCT	GGA	TTC	ACC	TTT	GAT	GAT	TAT	96
Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Asp	Asp	Tyr	
				145					150					155		
GCC	CTG	CAC	TGG	GTC	CGT	CAA	GCT	CCA	GGG	AAG	GGC	CTG	GAG	TGG	GTC	144
Ala	Leu	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val	
			160					165					170			
TCA	GGT	ATT	AGT	TGG	GAT	AGT	GGT	ACC	ATA	GGC	TAT	GCG	GAC	TCT	GTG	192
Ser	Gly	Ile	Ser	Trp	Asp	Ser	Gly	Thr	Ile	Gly	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val	
		175					180					185				
GGC	CGA	TTC	ACC	ATC	TCC	AGA	GAC	AAC	GCC	AAG	AAC	TCC	CTG	TAT		240
Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ala	Lys	Asn	Ser	Leu	Tyr		
90					195					200						
CAA	ATG	AAC	AGT	CTG	AGA	GCT	GAG	GAC	ACG	GCC	TTG	TAT	TAC	TGT		288
Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Leu	Tyr	Tyr	Cys	
205					210				215						220	
GTA	AAA	GAT	ATG	GGG	TCT	TCG	GTA	GTG	GCT	ACG	TAC	AAT	GCT	TTT	GAT	336
Val	Lys	Asp	Met	Gly	Ser	Ser	Val	Val	Ala	Thr	Tyr	Asn	Ala	Phe	Asp	
				225					230					235		
ATC	TGG	GGC	CAA	GGG	ACA	ATG	GTC	ACC	GTC	TCT	TCA					372
Ile	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Met	Val	Thr	Val	Ser	Ser					
			240					245								

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 18:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 124 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 18:

Gln	Val	Lys	Leu	Leu	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Arg	
1				5					10					15		
Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Asp	Asp	Tyr	
			20					25					30			
Ala	Leu	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val	
		35				40						45				
Ser	Gly	Ile	Ser	Trp	Asp	Ser	Gly	Thr	Ile	Gly	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val	
	50					55				60						
Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ala	Lys	Asn	Ser	Leu	Tyr	

65					70					75					80
Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Leu	Tyr	Tyr	Cys
				85					90					95	
Val	Lys	Asp	Met	Gly	Ser	Ser	Val	Val	Ala	Thr	Tyr	Asn	Ala	Phe	Asp
			100					105					110		
Ile	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Met	Val	Thr	Val	Ser	Ser				
		115					120								